

Aus dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg,
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Moll

CD34 positive Fibrozyten in gut- und böartigen Veränderungen des Ovars

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Phillips-Universität Marburg
vorgelegt von

Katharina Kläning aus Marburg

Marburg, 2017

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am 23.02.2017**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Barth

Korreferent: Prof. Dr. Kalder

Inhaltsverzeichnis

Deckblatt	1
Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1 Fibrozyten und ihre Rolle in der Wundheilung und bei malignen Prozessen	5
1.2 Fibrozytenvorkommen in tumorinduzierte Stromaveränderungen	7
1.3 Tumore des Ovars	10
1.4 Zielsetzung	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Fallauswahl	12
2.2 Gewebeproben	12
2.3 Herstellung der Präparate	15
2.3.1 Schnittherstellung	15
2.3.2 Immunhistochemische Färbemethode Einfachfärbung	15
2.3.3 Immunhistochemische Färbemethode Doppelfärbung	17
2.3.4 Zusammenfassung Färbungen	19
2.4 Auswertung	19
3. Ergebnisse	22
3.1 Auswertungstabellen	22
3.2 Gesundes Ovar	25
3.2.1 Makroskopische Anatomie	25
3.2.2 Mikroskopische Anatomie	25
3.2.3 Immunhistochemie am gesunden Ovar, CD 34	26
3.2.4 Immunhistochemie am gesunden Ovar, α -SMA	30
3.2.5 Immunhistochemie am gesunden Ovar, SPARC	33
3.2.6 Immunhistochemie am gesunden Ovar, TGF- β	37
3.3 papillär-seröse Zystadenofibrome	39
3.3.1 ödematöse Papillen	42
3.4 muzinöse Ovarialkarzinome	47
3.5 papillär-seröse Ovarialkarzinome	54
4. Diskussion	61

5. Zusammenfassung	64
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	66
7. Chemikalienverzeichnis	67
8. Literaturverzeichnis	69
9. Verzeichnis der akademischen Lehrer	74
10.Danksagung	75

1. Einleitung

Laut Krebsstatistik der Weltgesundheitsorganisation verstarben im Jahr 2012 weltweit 8,2 Millionen Menschen an bösartigen Neubildungen¹. Diese Daten allein zeigen die Bedeutung, sich wissenschaftlich mit malignen Erkrankungen auseinander zu setzen ohne dass an dieser Stelle die klinischen Aspekte wie nebenwirkungsreiche Behandlungsmethoden, psychische Belastungen und aktuell teilweise schlechte Heilungsaussichten erwähnt wurden.

Die Erforschung maligner Erkrankungen hat zwei Ansatzpunkte: Zum einen die Analyse der Eigenschaften der Krebszellen mit genetischen und zellbiologischen Methoden; zum anderen die Untersuchung des Tumorstromas. Hierunter versteht man die extrazelluläre Matrix des Tumors und die sie bildenden Zellen.

Zu den Zellen des tumorassoziierten Stromas gehören Fibrozyten und Makrophagen. In den letzten Jahren zeigten experimentelle Studien, dass erstere nicht ortsständig sind, sondern sich von zirkulierenden Zellen aus dem Knochenmark ableiten.

Die erwähnten Fibrozyten, ihre Zelleigenschaften und mit ihnen in Zusammenhang stehende Botensubstanzen wie CD 34, SPARC und TGF- β wurden an gut- und bösartigen Veränderungen insbesondere der Mamma, aber auch an weiteren Organen untersucht. Die vorliegende Doktorarbeit ergänzt dies um die Darstellung am menschlichen Ovar.

1.1 Fibrozyten und ihre Funktionen in der Wundheilung und bei malignen Prozessen

Unter physiologischen Bedingungen benötigt das Gewebe für seinen Erhalt einer ausreichenden Nutrition, vor allem über den Blutweg, Schutz und eine Einbindung in die Prozesse seiner Umgebung benötigt. Auch für Tumorgewebe trifft das zu. Das den Tumor umgebende Stroma muss diese Funktionen erfüllen, um Invasion, Gefäßinfiltration und fakultativ auch Metastasierung überhaupt erst möglich zu machen. Folglich haben wahrscheinlich nur solche Tumore einen Selektionsvorteil, die in der Lage sind, ihr Milieu so zu modulieren, dass diese Voraussetzungen gewährleistet sind. Eindrücklich schildern dies Framson et al.: Tumorzellen, die metastasieren, werden mit Samen verglichen, die im Gewebe einen fruchtbaren Boden finden müssen².

Die Kenntnisse um die Abläufe im interzellularen Mikromilieu bei Gewebsveränderungen wurden besonders intensiv am Beispiel der Wundheilung untersucht, die schon lange als ein Prozess gilt, der in überraschend vielen Aspekten dem invasiven Tumorwachstum vergleichbar ist. Ein Karzinom wäre demnach eine nicht heilende Wunde³:

Wenn Bindegewebe verletzt wird folgt für die Wundheilung ein komplexes Zusammenspiel zwischen ortsansässigen und –fremden Zellen, Botenstoffen und extrazellulären Elementen des Bindegewebsapparats. 1994 machte eine Arbeitsgruppe um R. Bucala⁴ die Entdeckung, dass nicht nur Fibroblasten aus dem ortsnahen Bindegewebe in die Wundheilung mit einbezogen werden. Es wurde vielmehr eine neue Subpopulation von Fibroblasten entdeckt, die aus dem Blut, abstammend von zirkulierenden CD14 positiven Monozyten⁵, in verletztes Bindegewebe eindringen und sich in ihren Oberflächeneigenschaften (Kollagen+/ Vimentin+/ CD34+) von den ortsansässigen Fibroblasten, Monocyten, Langerhanszellen, Endothelzellen und T-Lymphozyten unterscheiden. Für diese Subpopulation wurde der Terminus „Fibrozyten“ eingeführt, der auch in der vorliegenden Arbeit beibehalten wird.

Die Herkunft der Fibrozyten wird im Knochenmark oder in einem anderen Gewebe vermutet, zumal die Fibrozyten zwar teilweise, aber nicht obligatorisch CD45 exprimieren⁶.

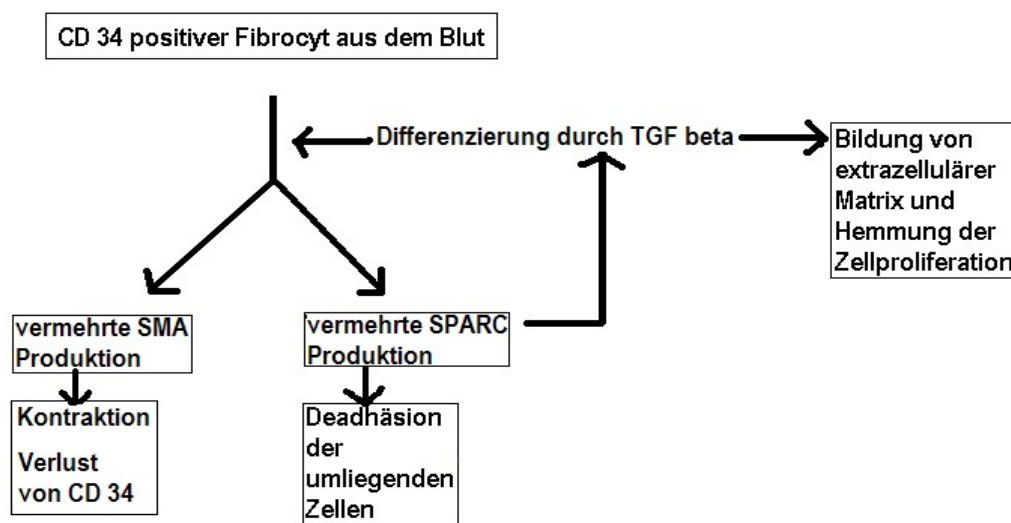
CD34 ist ein Zelloberflächen-Glycoprotein, das als Marker für Zellen der Hämatopoese gilt⁷, es findet sich aber auch in Endothelien, in dendritischen Zellen der Dermis, in Zellen der Endoneuralscheide und anderen.⁸ CD34 spielt eine Rolle als L-Selectin Ligand.

Die bekannten Funktionen der CD34 positiven Fibrozyten in Wundbetten beinhalten laut weiteren Untersuchungen die Synthese der extrazellulären Matrixproteine Kollagen I und III, Cytokinen und Chemokinen wie TGF- β ⁹ und um die Antigenpräsentation mithilfe der Oberflächenmarker CD83 und CD86¹⁰. Außerdem exprimieren die aus dem Blut stammenden Fibrozyten nicht nur die bereits erwähnten Oberflächeneigenschaften, sondern auch CD13 und CD45, Marker für Zellen myeloider Abkunft und produzieren angiogenetisch potente Substanzen¹¹. Weiterhin gelingt es in vitro CD14 positive Monozyten durch Zugabe von TGF- β in CD34 positive Fibrozyten auszudifferenzieren, die bei weiterer Exposition mit TGF- β in der Lage sind, Glattmuskelaktin (α smooth

muscle actin/ α -SMA) zu exprimieren und so eine Rolle in der Kontraktion von Wunden spielen können^{12 13}.

Zusammenfassend hat man mit den CD34 positiven Fibrozyten eine Zellpopulation identifiziert, die aufgrund ihrer vielfältigen möglichen Funktionen eine Schlüsselrolle in den stromalen Prozessen der Wundheilung spielen. Die Zusammenhänge werden in der folgenden Abbildung 1 verdeutlicht:

Abbildung 1



1.2 Fibrozytenvorkommen in tumorinduzierten Stromaveränderungen

Fibrozyten finden sich nicht nur, wie eingangs beschrieben, in der Wundheilung, sondern auch im tumorassoziierten Stroma, was mehrere Arbeitsgruppen mit der Darstellung der Variabilität der Anwesenheit von CD34 positiven Fibrozyten und funktional assoziierten Markern (SPARC, α -SMA, TGF- β) in unterschiedlichen Geweben und ortsansässigen Primärtumoren dargestellt haben, wie die folgenden Ausführungen erläutern:

Gesundes Gewebe:

Gesundes Brustgewebe enthält intralobulär CD34 positive Zellen¹⁴, die überwiegend eine spindelige Form haben und zusätzlich zu CD34 auch Vimentin exprimieren. α -SMA Expression wurde ihnen dort – im Gegensatz zu an der Wundheilung beteiligten Fibrozyten¹⁵ – nicht nachgewiesen. Insgesamt sprechen Morphologie und Anfärbecharakteristika dafür, dass es sich dabei um die eingangs beschriebenen Fibrozyten handelt.

TGF- β spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung der aus dem Blut stammenden CD34 positiven Fibrozyten und regt sie bei weiterer Exposition zur Bildung von Glattmuskelaktin, erhöhter Kollagensynthese¹⁶ und erhöhter Produktion von SPARC¹⁷ an. Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine überschießende Anwesenheit von TGF- β in der Wundheilung die Narbenbildung begünstigt¹⁸, was mit der erwähnten erhöhten Kollagensynthese im Einklang steht.

TGF- β , ein Cytokin, von dem drei Unterformen (I, II, III) bekannt sind, ist einer der bekanntesten Inhibitoren der Zellreplikation durch Stopp des Zellzyklus im Übergang der G1 zur S Phase, insbesondere bei Epithelien und glatten Muskelzellen; artikuläre Chondrozyten und Fibroblasten werden in ihrer Replikation jedoch nicht inhibiert. Es hemmt außerdem B und T Lymphozyten, wirkt demnach immunsuppressiv, hemmt Matrixmetalloproteinasen und fördert die Bildung von extrazellulärer Matrix¹⁹.

Gutartige Läsionen:

In gutartigen Läsionen wie Fibroadenomen etc. zeigten sich ebenfalls spindelförmige CD34 positive Zellen und plump-oval geformte α -SMA positive Zellen.^{20 21 22}

Bösartige Läsionen:

Hingegen war das Stroma bei karzinomatösen Veränderungen der Brust durch einen Verlust von CD34 positiven Zellen gekennzeichnet, so beschrieben bei malignen Spindelzellkarzinomen der Brust²³, bei invasiven duktalem Karzinomen^{24 25}, invasivem duktalem Carcinoma in situ (DCIS)²⁶, und tubulären Karzinomen²⁷ sowie lobulären Karzinomen²⁸. Auch für weitere Gewebe und ortsansässigen Karzinomen wie bei kolorektalen Karzinom^{29 30}, Adenokarzinomen des Pankreas³¹, invasivem Cervix Karzinom³², invasiven Karzinomen im Kopf-Hals Bereich³³ und vaskularisierten Leiomyomen des Uterus³⁴ gelten die gemachten Beobachtungen, dass sich in gesunden

Gewebeabschnitten CD34 positive spindelförmige Zellen finden, im Bereich maligner Karzinome jedoch nicht.

Hingegen beschreiben zwei Studien für diffuse Adenokarzinome des Magens³⁵ und dendritische Zellen am Rande von Speicheldrüsentumoren³⁶ keinen signifikanten Verlust von CD34 positiven Zellen trotz eines invasiven Prozesses.

In malignen Veränderungen trat der beschriebene Verlust CD34 positiver Zellen ein, α -SMA positive Myofibroblasten hingegen fanden sich reichlich^{37 38 39 40 41 42 43 44}.

Ausnahmen bei der Verteilung von α -SMA wurden für radiäre Narben der Brust postuliert, die im Zentrum CD34 negativ und α -SMA positiv waren, also ein Anfärbeverhalten wie bei Anwesenheit eines invasiven Karzinoms zeigten. Es besteht aber klinisch ein enger Zusammenhang zwischen den noch als benigne geltenden radiären Narben und malignen Prozessen, da radiäre Narben häufig in tubuläre Karzinome⁴⁵ entarten sollen. Ebenfalls auffällig (also CD 34-, α -SMA -) zeigten sich maligne Melanome⁴⁶.

Bei Untersuchungen an Gewebeschnitten von Patienten mit Larynx-Karzinomen konnte eine vermehrte Anfärbarkeit der Tumorzellen für TGF- β festgestellt werden und es wurde über die entscheidende Beteiligung dieses Cytokins an einem Nebeneffekt invasiven Tumorwachstums, der sog. stromalen Desmoplasie, das heißt der Anreicherung von extrazellulärer Bindegewebsmatrix im peritumorösen Stroma, diskutiert⁴⁷.

Auf die Tumorzellen selbst scheint TGF- β allerdings keinen obligatorisch wachstumshemmenden Effekt⁴⁸ zu haben, wofür eine Herunterregulation des TGF- β Rezeptors II dafür verantwortlich gemacht wird⁴⁹.

Auch SPARC (synonym: Osteonectin) scheint eine Rolle bei invasiven malignen Prozessen zu spielen: Porter et al. untersuchten bereits 1995 die Verteilung von SPARC in unterschiedlichen menschlichen Geweben und fanden ein verstärktes Anfärbeverhalten bei Fibrozyten und Endothelien in der Umgebung invasiv wachsender Tumoren. Auch Ovarien zeigten in der Mehrzahl der Fälle eine Anfärbarkeit⁵⁰.

Bei SPARC handelt es sich um ein extrazelluläres Glycoprotein, das –außer im Knochen- nur bei Umbauprozessen im Gewebe zu finden ist. Es kann an viele Strukturen der extrazellulären Matrix binden, etwa Kollagen I und IV sowie Calcium, kann in vitro die Zellmorphologie dahingehend verändern, dass es zu einer Deadhäsion der betroffenen Zellen untereinander kommt und wird bei invasiven Meningeomen als

Diagnostikum verwendet, da es bei Metastasierung in höheren Konzentrationen zu finden ist⁵¹, fördert die Angiogenese und kann die TGF- β Sekretion steigern⁵².

SPARC könnte durch seine Deadhäsionsinduktion einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, dass sich Tumore in umliegendes Gewebe eindringen können; interessant ist in diesem Zusammenhang, dass SPARC - Knockout Mäuse u.a. ein verändertes Tumorstadium aufweisen. Manche Tumore haben ein reduziertes Wachstum, während andere größer werden, da den Tumoren eine Kapsel aus extrazellulärer Matrix fehlt⁵³.

1.3 Tumoren des Ovars

Spindelige, CD 34 positive Zellen, α -SMA und TGF- β spielen nach aktuellem wissenschaftlichen Kenntnisstand eine wichtige Rolle in der Wundheilung und bei gut- sowie bösartigen Gewebsveränderungen. Für viele Neoplasien wurde die Verteilung der Marker bereits beschrieben und deutet darauf hin, dass in maligne veränderten Gewebsabschnitten im Vergleich zu gesunden ein Verlust der immunhistochemischen Anfärbbarkeit für CD34 mit einer gleichzeitig zunehmenden Anfärbbarkeit für α -SMA, SPARC und TGF- β zu beobachten ist, die mit den bekannten physiologischen Funktionen logisch in Verbindung gebracht werden kann.

In diesem Zusammenhang erscheint es erforderlich, die Beschreibung des Färbeverhaltens an weiteren Organen und ihren pathologischen Veränderungen vorzunehmen.

Bisher wurden die oben beschriebenen Gewebsveränderungen noch nicht am menschlichen Ovar und verschiedenen benignen und malignen Veränderungen desselben untersucht.

Die Tumore des Ovars sind eine heterogene Gruppe gut- und bösartiger Neubildungen. Die bösartigen Neubildung rangieren mit einer altersstandardisierten Inzidenz von ca. 10 pro 100.000 Fälle an 6. Stelle der gynäkologischen Tumore in Deutschland und stehen bei der altersstandardisierten Krebs-Mortalitätsrate sogar an dritter Stelle, nur noch übertroffen von Brustkrebs und kolorektalen Tumoren⁵⁴.

1.4 Zielsetzung

Es liegt nach Analyse der Fachliteratur der begründete Verdacht nahe, die oben beschriebenen CD34 positiven Zellen könnten im Zusammenspiel mit TGF- β , α -SMA und SPARC eine wichtige Rolle sowohl in der Wundheilung als auch in der Reaktion von peritumorösen Gewebe auf invasives Wachstum von malignen Tumoren spielen, da dies eine Auflösung von festen ortsansässigen Strukturen voraus setzt.

Die vorliegende Arbeit untersucht menschliche Ovarien auf die Anfärbbarkeit der hier dargelegten Faktoren.

Die hierfür verwendete Immunhistochemie ist für diese Untersuchung besonders geeignet, da die Anfärbeintensität nicht nur semiquantitativ ausgewertet werden, sondern auch noch den unterschiedlichen Gewebsregionen zugeordnet werden kann.

Es wurden nach immunhistochemischer Färbung dabei folgende benigne und maligne Veränderungen berücksichtigt: pathologisch veränderte Ovarien mit Zystadenofibromen, papillär-seröses Ovarialkarzinom, muzinöses Ovarialkarzinom, endometrioides Karzinom und maligne Müller Mischtumoren (synonym: Karzinosarkome) im Vergleich zu gesunden Ovarien.

Die vorliegende Arbeit beabsichtigt, mehr über das Stroma gut- und bösartiger Tumore des Ovars und der dort ansässigen CD 34 positiven Fibrozyten zu eruieren. Auch soll geprüft werden, ob die Verteilung CD 34 positiver Fibrozyten im Ovar als ein diagnostisches Kriterium der Pathologie zur mikroskopischen Differenzierung zwischen gesundem und entartetem Gewebe geeignet ist.

2.Material und Methoden

2.1 Fallauswahl

Die verwendeten Gewebeproben stammen von Patientinnen, die sich in der Behandlung des Universitätsklinikums Marburg befanden und im Zeitraum zwischen den Jahren 2000 und 2005 im Pathologischen Institut der Universität befundet und archiviert wurden.

Die Vorauswahl der Fälle wurde über die Diagnosen „gutartige Veränderungen des Ovars“ und „böartige Veränderungen des Ovars“ getroffen.

Die Patientendaten wurden nach datenschutzrechtlichen Richtlinien behandelt und in Folge anhand der im Archiv üblichen Journalnummern anonymisiert.

Die endgültige Auswahl erfolgte durch Sichten der bereits vorhandenen Schnitte in Hämatoxylin-Eosin Färbung. Dabei wurde neben der Diagnose und deren Eindeutigkeit auch die Anschaulichkeit der zu untersuchenden Abschnitte als Kriterium herangezogen. Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit die in Tabelle 1 aufgelisteten 72 Fälle ovarieller Veränderungen von 42 unterschiedlichen Patienten ausgewählt. Ebenso wie oben beschrieben erfolgte auch die Auswahl von 4 Fällen mit Diagnose „duktales Mamma-Karzinom“ (Tabelle 2), um die Vergleichbarkeit mit bereits wissenschaftlich untersuchten Geweben herzustellen.

Grading und Staging der Fälle mit malignen Veränderungen sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

2.2 Gewebeproben

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Gewebeproben stellen alle Resektionsgut da, das zur Diagnosestellung in das pathologische Institut der Philipps-Universität Marburg gesandt wurde. Die Gewebeproben des Ovars wurden in 10% Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet, von denen mit einem Schlittenmikrotom ca. 3µm dünne Schnitte abgehobelt und standardmäßig mit Hämatoxylin-Eosin und PAS für Routinezwecke gefärbt wurden.

Tabelle 1

Diagnose	Anzahl Fälle	Anzahl Patienten	Alter (Mittelwert)	Alter (Median)
Papillär seröses Zystadenofibrom <ul style="list-style-type: none"> Davon 2 Fälle papilläres, seröses und muzinöses Zystadenofibrom Davon 2 Fälle mit zusätzlicher Präkanzerose 	21	13	61	66
Papillär seröses Ovarialkarzinom <ul style="list-style-type: none"> Davon 1 Fall mit zusätzlichen kleinen muzinösen Anteilen Davon 1 Fall serös-papilläres Zystadenokarzinom 	20	13	62	67
Gesundes Ovar	9	6	49	41
Muzinöses Adenokarzinom des Ovars <ul style="list-style-type: none"> Davon zwei Fälle mit zusätzlichem papillärem Anteil 	14	8	64	60
Endometrioides Karzinom des Ovars	3	2	47	54
Peritonealkarzinose	2	2	72	-
schlecht differenziertes Adenokarzinom des Ovars	1	1	66	-
Kazino-Sarkom des Ovars <ul style="list-style-type: none"> Davon 1 Fall mit zusätzlichem Zystadenofibrom 	2	2	75	-

Tabelle 2

Diagnose	Anzahl Fälle	Anzahl Patienten	Alter (Mittelwert)	Alter (Median)
Duktales Mamma CA	4			

Tabelle 3

Diagnose	Fall/ Journalnummer	Grading	Staging
Muzinöses Ovarialkarzinom	15162/04	G2	pT3c pNx pMx L0 V0 R0
	17272/03	G2	pT3c pN0 pM0 L0 V0
	2450/04	G2	pT3c pN1 pMx L0 V0 R0
	12859/03	G2	pT3b pNx pMx L0 V0 R0 IMH
	17220/03	G2	pT3c pN0 pM0 N0 V0
	15213/04	G2	pT3c pN1 pM1 L0 V0
	1716/00	G1	pT3 oder pathologischer
	4950/00	G2	pT2a oder pathologischer
	15616/03		
	1717/00	G1	pT3 oder pathologischer
	12758/01	G1	
Endometrioides Ovarialkarzinom	11396/04	G2	pT1a
	8920/04	G1	pT1b pNx pMx L0 V0 R0
	11396/04	G2	pT1a
Peritonealkarzinose	12617/04	G2	pT3c pN1 pMx L0 V1 R0
	10367/04	G2	
Schlecht differenziertes Adenokarzinom	16223/04	G3	
Karzinom Sarkome	16617/04	G3-G4	IMH mit Rhabdomyosarkomkomponente
	18218/04	G3-G4	pT1b pN0 pMx L0 V0 R0
Papillär seröses Ovarialkarzinom	13980/04	G2	pT3c pN1 pMx L0 V0
	13981/04	G2	pT3c pN1 pMx L0 V0
	12861/04	G2	pT3c pN1 pM0 L0 V0 R0
	12860/04	G2	pT3c pN1 pM0 L0 V0 R0
	12716/04	G2	pT3c pN0 pM1 (Milz, DIC)
	10948/04	G2	pT3c pNx pMx L0 V0
	9931/04	G2-G3	pT2b pN1 pM1(LYM)

	11406/04	G1	pT3b pN0 pMx L0 V0 R0
	12588/04	G2	pT3a pN1 pMx L0 V1 R0
	11405/04	G1	pT1b
	10948/04	G2	pT3c pNx pMx L0 V0
	9053/04		pT3c
	9232/04	G2	pT3c pN1 pMx L0 V0 R0
	15916/04	G2	pT2c pN0 pMx L0 V0 R0
	15746/04	G2	pT3c pN0 pMx L0 V0
	15785/04	G2	pT3c pN0 pMx L0 V0
	8897/00	G2	IMH
Duktales Mamma CA			

2.3 Herstellung der Präparate

(Verzeichnis der verwendeten Chemikalien etc. befindet sich im Anhang)

2.3.1 Schnittherstellung

Von den im Standardverfahren konservierten Gewebeproben in Paraffineinbettung erfolgte nach oben beschriebener Auswahl (Sichtung von Standard HE-Präparaten) die erneute Anfertigung von Schnitten mit dem Schlittenmikrotom, allerdings mit einer Stärke von ca. 1µm. Diese wurden zum Glätten auf ein 60°C heißes Wasserbad gelegt und anschließend auf Spezialobjektträger (Superfrost®) gezogen. Um überschüssiges Paraffin abtropfen zu lassen, wurden die Objektträger für 24h bei 60°C im Heizschrank inkubiert.

2.3.2 Immunhistochemische Färbemethode Einfachfärbung

Die vorbereiteten Schnitte wurden mit der ABC Peroxidase-Methode am Paraffinmantel gefärbt, dabei wurde das standardmäßige Protokoll benutzt.

Nach Entparaffinierung in Xylol und absteigender Alkoholreihe wurde die endogene Peroxidase mit 6ml 30%igem Wasserstoffperoxid in 200ml Methanol geblockt.

Die Demaskierung der Antigene und der Andau fanden antikörperspezifisch statt (Tabelle 4).

Nach dieser Vorbehandlung wurden die Schnitte mit PBS-Puffer in Coverplates® eingespannt und mit 10% Normalserum (Horse) in PBS Puffer zur Abdeckung unspezifischer Bindungen im Gewebe versehen. Ohne zwischengeschalteten Spülschritt mit PBS wurde der Primärantikörper in jeweiliger Verdünnung aufgebracht und bei 37°C im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Nach einer PBS Spülung erfolgte dann das Aufbringen des Sekundärantikörpers (Tabelle 5).

Es folgte der ebenfalls in PBS Puffer gelöste ABC Komplex.

Die so behandelten Schnitte wurden mit in 200ml Tris-HCL Puffer gelösten 200mg Diaminobenzidintetrahydrochlorid und 100µl 30% Wasserstoffperoxid gefärbt und anschließend in Mayers-Hämalaunlösung gegengefärbt, gebläut in Leitungswasser und aufsteigender Alkoholreihe und schließlich in Xylol gebracht.

Anschließend erfolgte das Eindeckeln mit Entellan®.

Tabelle 4

Primärantikörper	Beschreibung
TGF-β-Rezeptor	Verdünnung: 1:25 in 1% Normalserum (Horse)/PBS Vorbehandlung: 4x 5min Mikrowelle bei 600 Watt, Spülung mit TBS Puffer
CD34	Verdünnung: 1:50 in 1% Normalserum (Horse)/PBS Vorbehandlung: 3x 5min Mikrowelle bei 600 Watt, Spülung mit TBS Puffer
Osteonectin	Verdünnung: 1:40 in 1% Normalserum (Horse)/PBS Vorbehandlung: 3x 5min Mikrowelle bei 600 Watt, Spülung mit TBS Puffer
α-SMA, Clon ASM1	Verdünnung: 1:200 in 1% Normalserum (Horse)/PBS Vorbehandlung: Inkubation in 0,1% Trypsinlösung bei 37°C für 15 min
CD117	Verdünnung: 1:100 in 1% Normalserum (Horse)/PBS Vorbehandlung: 3x 5 min Mikrowelle bei 600 Watt, Spülung mit TBS Puffer
CD83	Verdünnung 1:20 in 1% Normalserum (Horse)/PBS Vorbehandlung: 3x 5 min Mikrowelle bei 600 Watt, Spülung mit TBS Puffer

Tabelle 5

Primärantikörper	Sekundärantikörper
TGF- β -Rezeptor	IgM (Mouse) Verdünnung: 1:100 1% Normalserum (Horse)/PBS
CD34	IgG1 (Mouse) Verdünnung: 1:100 1% Normalserum (Horse)/PBS
Osteonectin	IgG1 (Mouse) Verdünnung: 1:100 1% Normalserum (Horse)/PBS
α -SMA, Clon ASM1	IgG2a (Mouse) Verdünnung: 1:100 1% Normalserum (Horse)/PBS
CD117	IgG (Rabbit) Verdünnung: 1:100 1% Normalserum (Horse)/PBS
CD83	IgG Verdünnung 1:100 1% Normalserum (Horse)/PBS

2.3.3 Immunhistochemische Färbemethode Doppelfärbung

Die Doppelfärbung der Präparate wurde mit Antikörpern gegen CD 34 und TGF- β -Rezeptor nach zwei gemeinsam verwendeten Methoden hergestellt, zum einen der endogenen Peroxidase Methoden und zum anderen mit der auch bei der Einzelfärbung verwendeten endogene alkalische Phosphatase Methode.

Die Schnitte wurden zuerst in Xylol und absteigendem Alkohol entparaffiniert und anschließend in ein Bad aus 200ml Methanol plus 3ml 30% Wasserstoffperoxid für 30 min getaucht. Mit diesem Arbeitsschritt wurde die endogene Peroxidase geblockt, eine Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase erfolgte durch die sich anschließende Hitzevorbehandlung. Der Gebrauch von Levamisol zum Blocken dieses Enzyms war somit nicht erforderlich.

Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch eine Hitzevorbehandlung. Die Schnitte wurden in Copeline® Gefäße gebracht und mit 4°C kalten Citratpuffer bedeckt und bei 600 Watt 4x 5min in der Mikrowelle erhitzt.

Anschließend kühlten die Schnitte in Citratpuffer für 15 min ab und wurden mit TBS Puffer gespült und mit PBS Puffer in Coverplates eingespannt.

Die Schnitte wurden mit 10% Normalserum Horse in PBS für 20min vorinkubiert, es folgte das Auftragen des Primärantikörpers Nr.1, in diesem Falle TGF- β -Rezeptor

(Mouse) 1:10 verdünnt mit 1% Normalserum Horse in PBS. Die Schnitte wurden für 1h im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS gespült. Als Sekundärantikörper Nr.1 wurde IgM Anti-Mouse in einer Verdünnung von 1:100 in 1% Normalserum Horse in PBS aufgetragen und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Spülung mit PBS erfolgte das Auftragen des ABC Komplexes Nr.1 (ABC-AP Standard Vectastain ABC Kit®), der eine halbe Stunde einwirken musste, bevor wiederum mit PBS gespült werden konnte. Die Schnitte wurden dann aus den Coverplates® genommen und in eine Färbekammer gelegt. Aus dem verwendeten AP-Substrate Kit Histo/Vector Red® wurde Puffer (pH 8,2) auf die Schnitte getropft und für 5 min dort belassen, bevor er durch vorsichtiges Abklopfen der Objektträger wieder entfernt wurde. In 5ml des oben erwähnten Puffers wurden je 2 Tropfen Reagenz 1,2 und 3 aus dem Kit vermischt und auf die Schnitte verbracht. Die Färbekammer wurde anschließend für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgte das erneute Einspannen der Schnitte in Coverplates® mit PBS und das Aufbringen des Primärantikörpers Nr.2, in diesem Fall CD34 (Mouse) 1:40 verdünnt mit 1% Normalserum Horse in PBS.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank. Nach einer Spülung mit PBS wurde der Sekundärantikörper Nr.2, IgG 1 Anti-Mouse 1:100 verdünnt mit 1% Normalserum Horse in PBS und bei Raumtemperatur für 30 min einwirken gelassen. Es folgte der ABC Komplex Nr.2, in diesem Falle Vectastain ABC Elite®, der ebenfalls für 30 min einwirken musste. Die Schnitte wurden dann aus den Coverplates® genommen und in die Färbekammer gelegt. Es wurde mit dem Histogreen POD Substrat Kit® der Firma Linaris gearbeitet. TBS Puffer aus dem Kit (pH 7,2) wurde für 5min auf die Schnitte getropft, dann vorsichtig abgeklopft und eine Lösung aus 1ml Puffer (pH 7,2) mit je 2 Tropfen aus Flasche 2 und 3 gemischt und auf den Schnitten für 4 min belassen. Anschließend wurde 2x mit TBS Puffer gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Häkalaunlösung, anschließend Bläuen in Leitungswasser und aufsteigender Alkoholreihe bis zu Xylol und Eindeckeln mit Entellan ®.

2.3.4 Zusammenfassung Färbungen

Tabelle 6

Färbung	Anzahl Präparate Ovar	Anzahl Präparate Mamma
CD34	72	4
TGF- β -Rezeptor	72	-
Osteonectin	72	-
α -SMA	72	-
CD117	2	-
CD83	20	4
Doppelfärbung (CD34 / TGF- β -Rez.)	8	-

Somit standen für die anschließende Beurteilung 326 Präparate zur Verfügung.

Die Herstellung der Präparate fand im Zeitraum zwischen November 2004 und Oktober 2005 im Forschungslabor des Instituts für Pathologie der Philips Universität Marburg statt.

2.4 Auswertung

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops bewertet.

Dazu wurde maximal eine 400fache Vergrößerung (40fach Objektiv, 10fach Okular) heran gezogen.

Von Interesse war vorrangig die immunhistochemische Färbung. Durch die Behandlung mit Diamminobenzidin färben sich Zellen mit zu untersuchendem Merkmal braun an. Die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaulösung zeigte die übrigen Strukturen und diente so in erster Linie der Orientierung im Gewebeschnitt.

Falls keine Zelle braun gefärbt worden war, wurde die Färbeintensität mit 0 bezeichnet, bei Anfärbung einzelner Zellen mit +, bei ca. 50% der Zellen mit ++ und bei 100% der Zellen schließlich mit +++.

Im Zweifel wurde die geringere Färbung angenommen, eine diffuse, flauere Färbung wurde mit 0 bewertet.

Um die komplexe räumliche Verteilung der Anfärbeintensitäten zu standardisieren, wurden folgende Definitionen vorgenommen (siehe auch Abbildungen 2 und 3):

Physiologische Strukturen

- Gefäßendothel (Die Anfärbung des Gefäßendothels erlaubt die Kontrolle, ob eine Färbung erfolgreich war. Bei den Antikörpern CD34 und α -SMA sollte das Endothel immer angefärbt sein, unabhängig von umliegenden Gewebe.)
- Tumorfrees Stroma: Normales ovariell Stroma ohne pathologische Veränderungen
- Rete ovarii/ Mesovar

Pathologische Strukturen

- Ödematöses Stroma: durch Ödem stark aufgelockertes ovariell Stroma
- Zystenepithelien
- Perizystisches Stroma: tumorfreies, gesundes Stroma das unmittelbar an eine Zyste angrenzt.
- Tumorzentrum: ovariell Stroma im Zentrum eines Tumors
- Tumorperipherie: ovariell Stroma, das in den Randgebieten des Tumors zu finden ist.
- Tumorassoziertes Stroma: ovariell Stroma, das innerhalb eines Gesichtsfeldes bei 400facher Vergrößerung direkt an einen tumorös veränderten Bereich (Tumorperipherie) angrenzt.

Abbildung 2

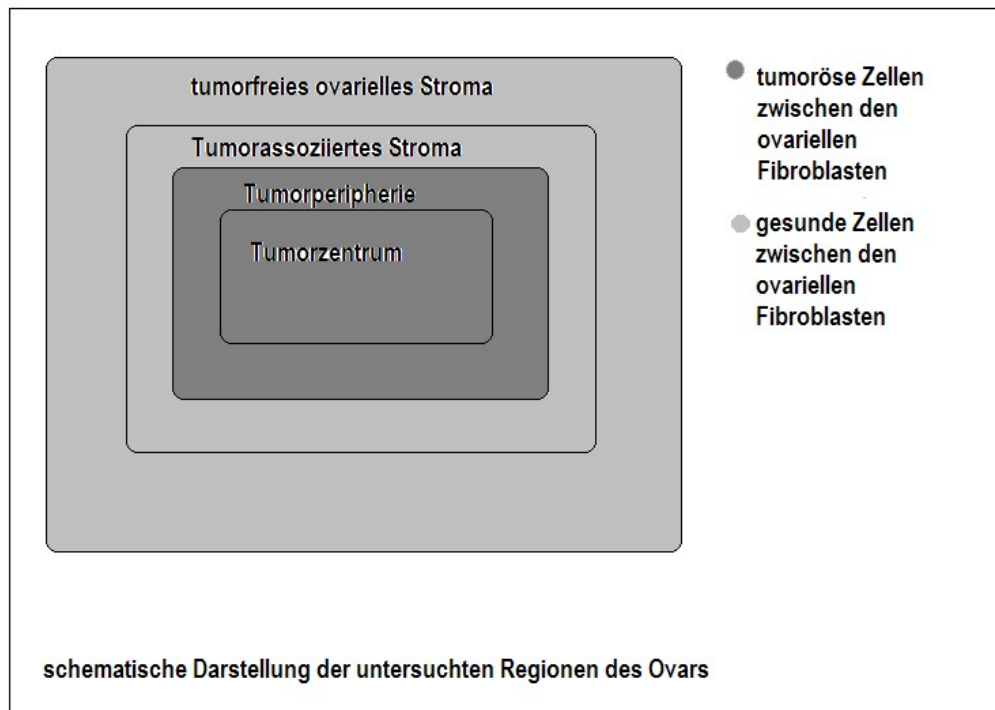


Abbildung 3 (Maske wurde für die Auswertung)

<i>Journalnummer</i>	CD34	α-SMA	TGF-β-Rezeptor	SPARC	(CD117) (CD83) (DF)
Zystenepithel					
Perizystisches Stroma					
Ödematöses Stroma					
Physiologisches Stroma					
Endothelien					
Tumorzentrum					
Tumorassoziertes Stroma					
Tumorperipherie					
Bemerkungen/ Diagnose:					

3 Ergebnisse

3.1 Auswertungstabellen

Anhand der im Abschnitt „Material und Methoden“ erläuterten Vorgehensweise ergeben sich die folgende Auswertungstabellen.

(Die jeweils grau unterlegten Felder kennzeichnen die häufigste Anfärbeintensität.)

Tabelle 7

Muzinöse Ovarialkarzinome

(13 Fälle, Fall 15162/04 2b aus der Wertung genommen, *5 Fälle fehlen, weil kein tumorfreies Stroma vorhanden war)

Bereich	CD34				α -SMA				TGF- β				SPARC			
	0	+	+	++	0	+	+	++	0	+	+	++	0	+	+	++
			+	+			+	+			+	+			+	+
Tumorfrees Stroma* (n=8)	7	0	1	0	4	1	2	1	4	4	0	0	5	2	1	0
Tumorzentrum (n=13)	1 3	0	0	0	1 1	1	1	0	9	3	0	1	1	0	1	0
Tumorassoziiertes Stroma (n=13)	1 2	0	1	0	0	0	4	9	3	3	7	0	2	6	5	0
Tumorperipherie (n=13)	1 3	0	0	0	9	2	2	0	2	9	1	1	1 1	0	2	0

Tabelle 8

Papillär-seröse Zystadenofibrome

(21 Fälle)

Bereich	CD34				α -SMA				TGF- β				SPARC			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
Tumorfrees Stroma ** (n=21)	15	4	2	0	19	2	0	0	12	9	0	0	17	4	0	0
Zystenepithel (n=21)	21	0	0	0	17	1	3	0	5	10	5	1	21	0	0	0
Perizystisches Stroma (n=21)	18	3	0	0	10	7	4	0	9	12	0	0	10	4	1	0
Ödem (Papille) (n=21)	17	2	0	0	6	5	8	0	12	5	2	0	11	6	2	0

(** „tumorfrees Stroma“ meint hier das gesunde ovarielle Stroma, obwohl kein Tumor anwesend ist)

Tabelle 9

Papillär-seröse Ovarialkarzinome

(20 Fälle, 12716/04 6; 9931/04 3c; 11406/04 2SS fehlen) (*in einem Fall kein tumorfreies Stroma vorhanden)

Bereich	CD34				α -SMA				TGF- β				SPARC			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
Tumorfrees Stroma* (n=16)	6	2	8	0	8	5	3	0	6	9	1	0	9	3	4	0
Tumorzentrum (n=17)	17	0	0	0	16	1	0	0	4	7	4	2	10	4	3	0
Tumorassoziertes Stroma (n=17)	7	6	4	0	6	5	5	1	7	9	1	0	9	5	3	0
Tumorperipherie (n=17)	17	0	0	0	15	2	0	0	4	6	5	2	9	4	4	0

3.2 Gesundes Ovar

Das gesunde menschliche Ovar lässt sich in diverse funktionelle und anatomische Abschnitte unterteilen. Da die Ovarien im Laufe des Zyklus und der Lebensphasen einer Frau nicht unerheblichen Veränderungen unterworfen sind, die sich vor allem aus den veränderten Hormonspiegeln ergeben, sei darauf hingewiesen, dass im Folgenden verstärkt auf die Morphologie postmenopausaler Ovarien eingegangen wird, da die Mehrzahl der untersuchten Ovarien von postmenopausalen Frauen stammen.

3.2.1 Makroskopische Anatomie

Die Ovarien liegen im Becken und sind mit Hilfe von Bändern und einer eigenen Bauchfellduplikatur, dem Mesovar befestigt. Zu dem Halteapparat gehören vor allem das Ligamentum suspensorium ovarii, das am oberen Ovarpol ansetzt und das Ligamentum ovarii proprium, welches vom unteren Pol zum Tubenwinkel zieht.

Die parenchymatösen Anteile des Ovars finden sich im Stroma ovarii, einem festen Bindegewebskörper, der von einer Bindegewebsschicht überzogen wird. Die äußerste Umhüllung wird vom Peritoneum gebildet.

Die Gefäßversorgung des Ovars erfolgt zum einen über einen direkten Ast der Aorta, die Arteria ovarica, die in ihrem Verlauf dem Ligamentum suspensorium ovarii folgt.

Zum anderen versorgt der Ramus ovaricus aus der A.uterina das Ovar von kaudal aus und bildet ein Anastomosengeflecht mit den Aufzweigungen der A.ovarica.

Am Hilus des Ovars treten die von glatten Muskelzellen umschiedenen Arterien in das Stroma ein oder sie penetrieren direkt die ovariellen Wandschichten.

Der venöse Abfluss erfolgt im rechten Ovar in die V.cava inferior, links in die V.renalis sinistra.

3.2.2 Mikroskopische Anatomie

Das Oberflächenepithel des Ovars wird von einer einlagigen Zellschicht modifizierter Peritonealzellen gebildet, die kubisch bis zylindrisch erscheinen. Sie sitzen auf einer dünnen Basalmembran, die sie vom Stroma trennt.

Das cortexnahe Stroma unterscheidet sich von dem funktionellen, medullären Stroma durch einen höheren Anteil an fibrösen Strukturen und kann daher auch als bindegewebiges Stroma bezeichnet werden.

Bei Übersichtsvergrößerungen bilden die einzelnen spindelförmigen Fibroblasten wellen- und wirbelartige Strukturen.

In den Ovarien von postmenopausalen Frauen nimmt der Anteil an Fibroblasten zugunsten von Kollagenfasern ab. Zusätzlich findet man noch eine weitere Zellart, die Myofibroblasten. Sie umschließen vor allem die ovariellen Gefäße, aber sie liegen auch frei im Stroma, ohne dass sich eine erkennbare Ordnung zeigen würde.

Am Hilus jedes Ovars findet man das Rete ovarii. Neben den Gefäßsträngen, die mit dicken Lagen glatter Muskulaturzellen umschieden sind, treten hier auch die Tuben in den Gewebsschnitten in Erscheinung.

Des Weiteren findet man Papillen und Zysten, die von einer einzelligen Lage kubischen Epithels bedeckt sind. Es sind auch Spindelzellen anzutreffen, die den Fibroblasten des Ovars morphologisch gleichen.

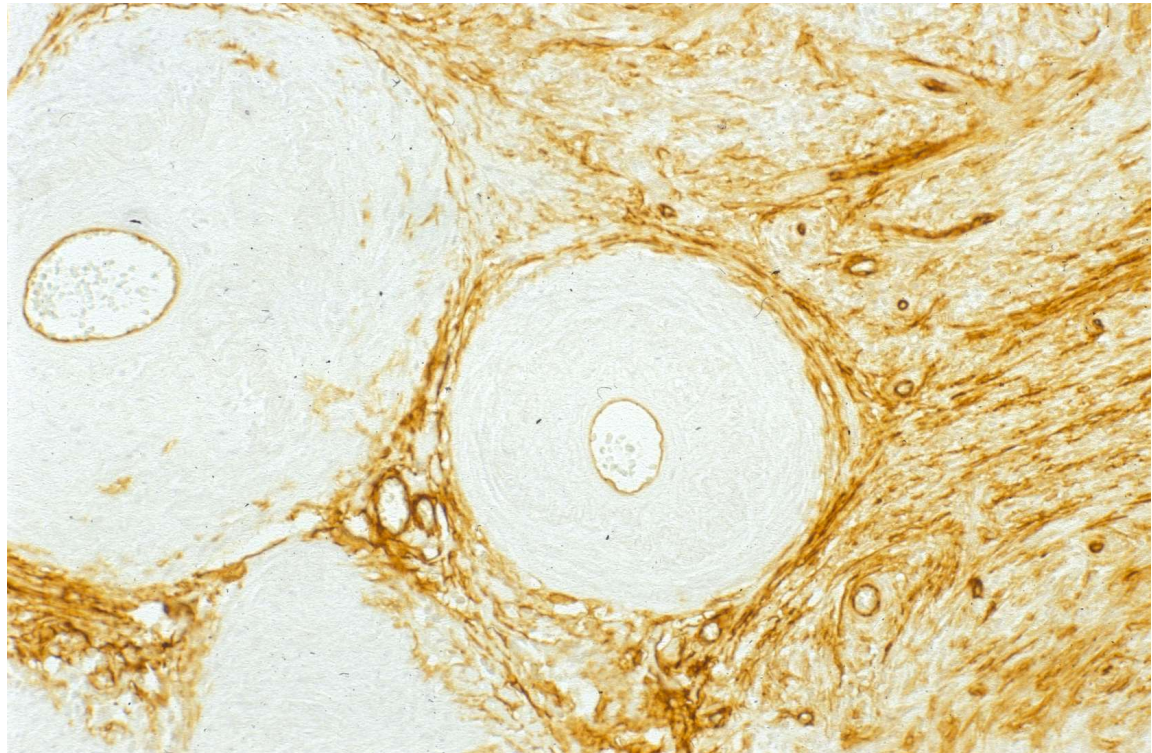
Nach der Menopause schrumpfen die Ovarien um etwa die Hälfte des Volumens, welches sie in der Reproduktionsphase ausfüllten. Im medullären Stroma findet man Corpora albicantia, die wie kleine weiße Narben imponieren und Psammomabodies. Verständlicherweise finden sich weder Primordialfollikel, Corpora lutea oder atretische Follikel, die ja an die Reproduktionsphase gekoppelt sind.

3.2.3 Immunhistochemie am gesunden Ovar, CD34

Als Postivkontrolle für eine stattgefundene Immunhistochemie mit CD34 kann die Anfärbung der Endothelien der ovariellen Gefäße sowohl in allen Stromaanteilen als auch im Rete ovarii gelten. In 100% aller ausgewerteten Fälle trifft dies zu (Abbildung 4).

Abbildung 4

(4-13.tif) Färbung mit CD34, Rete ovarii, deutliche Anfärbung des Endothels als Positivkontrolle



Die mit CD34 positiver Reaktion an der Zellmembran charakterisierten Zellen (Fibrozyten) sind nicht gleichmäßig über das ovarielle Stroma verteilt, sondern es finden sich regionale Unterschiede.

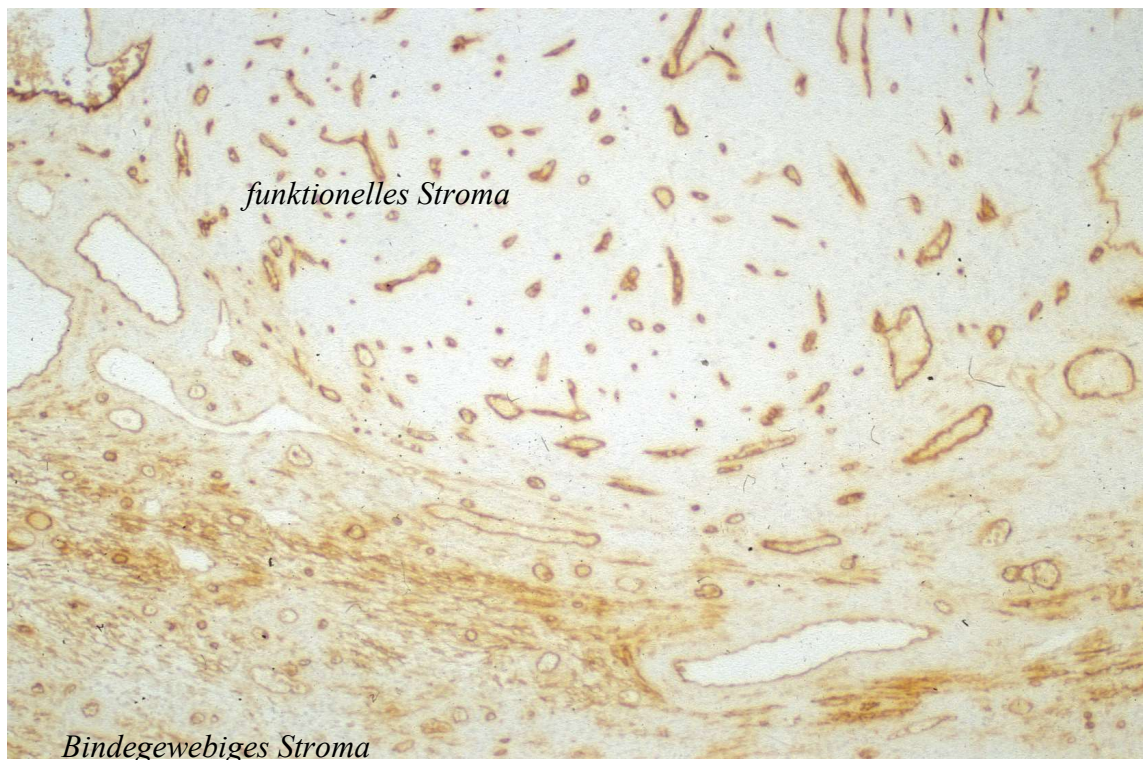
Die oben erwähnten spindelförmigen Zellen des Rete ovarii zeigen eine deutliche Anfärbung.

Im medullären, d.h. nicht cortextnahen ovariellen Stroma, das man auch zutreffend als funktionelles Stroma bezeichnen könnte, fehlt hingegen eine Anfärbung der Fibrozyten fast vollständig. Die cortextnahen, eher bindegewebigen Abschnitte zeigten häufiger eine Anfärbung, wenn auch nicht zu 100%. Etwa zwei von drei Zellen reagierten CD34 positiv (Abbildung 5).

Die spindelförmigen Zellen haben multiple, filigrane Fortsätze, sie liegen parallel nebeneinander und bilden so das schon erwähnte Wellen- und Wirbelmuster. Beispiele für diese Morphologie liefern die folgende Abbildung 6.

Abbildung 5

(4-14.tif) Färbung mit CD34, funktionelles und bindegewebiges Stroma im gesunden Ovar unterscheiden sich deutlich in der Anfärbeintensität



(3-5.tif) Färbung mit CD34, funktionelles Stroma mit Endothelfärbung als Positivkontrolle

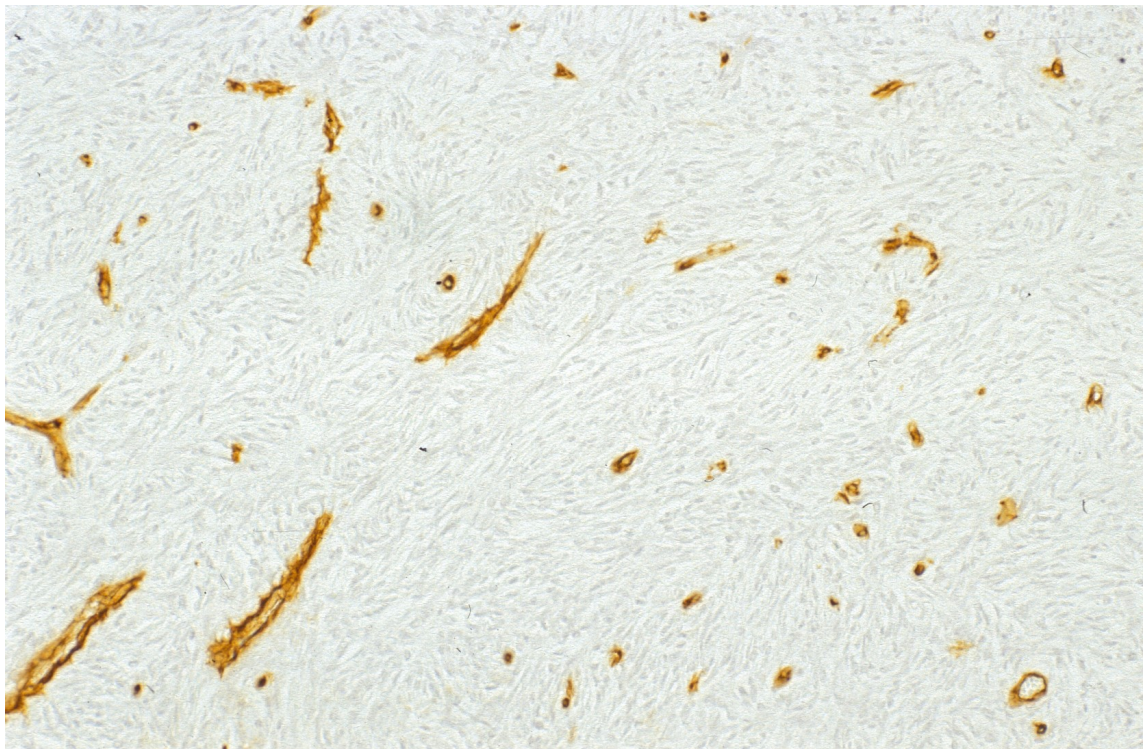
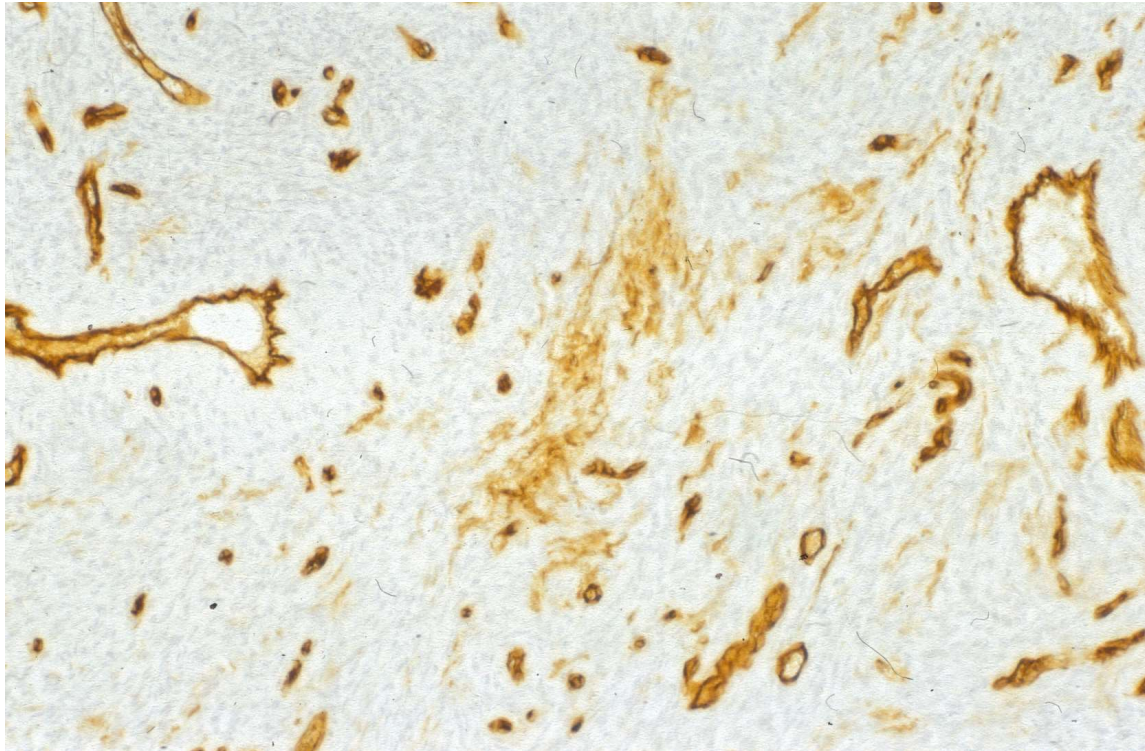
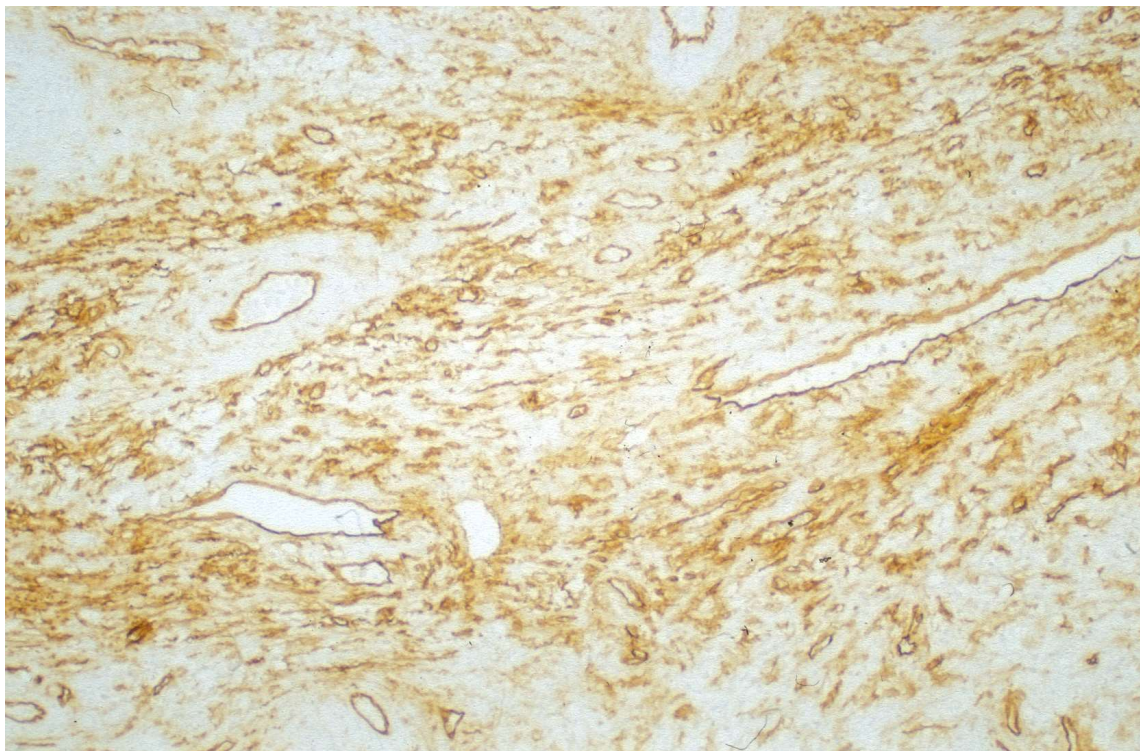


Abbildung 6

(3-1.tif) CD34 positives Stroma (positive Fibrozyten) im gesunden Ovar



(3-2.tif) CD34 positives Stroma (positive Fibrozyten) im gesunden Ovar

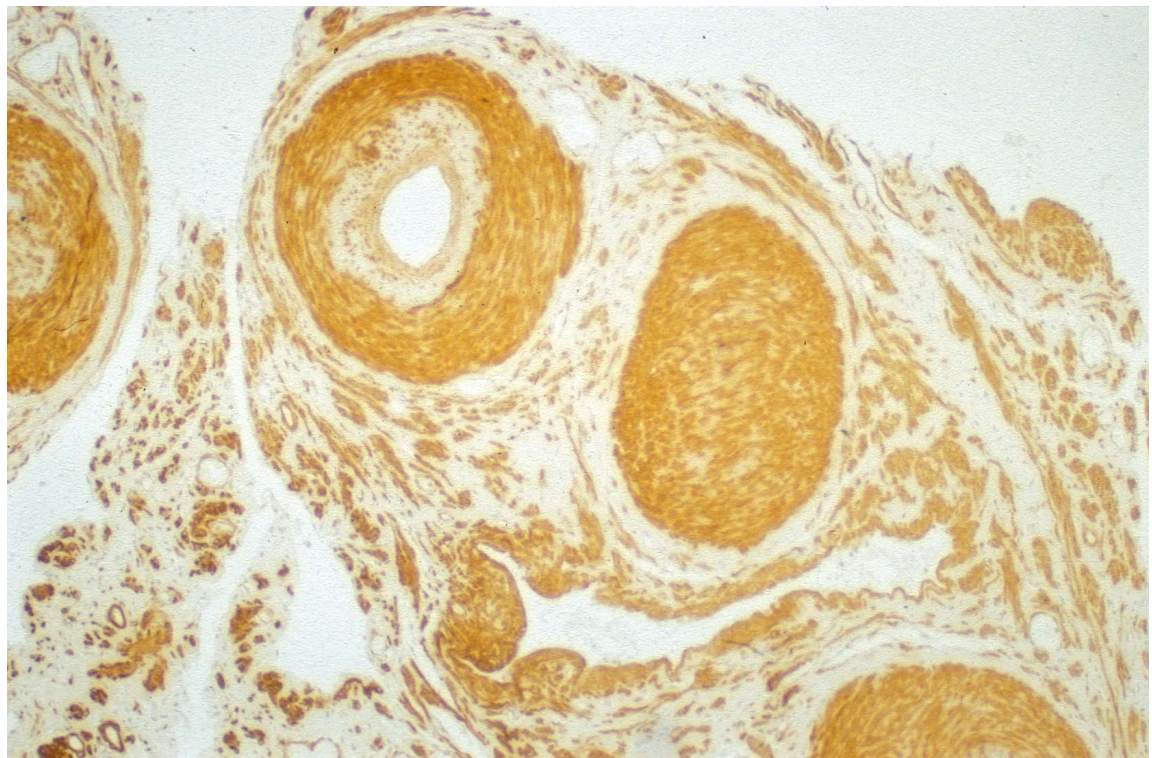


3.2.4 Immunhistochemie am gesunden Ovar, α -SMA (smooth muscle actin)

Als Positivkontrolle für die stattgefundene Färbung mit SMA können die glatten Muskelzellen um die ovariellen Gefäße dienen, die sich ausnahmslos in allen Regionen des Ovars und in allen untersuchten Schnitten anfärben (Abbildung 7).

Abbildung 7

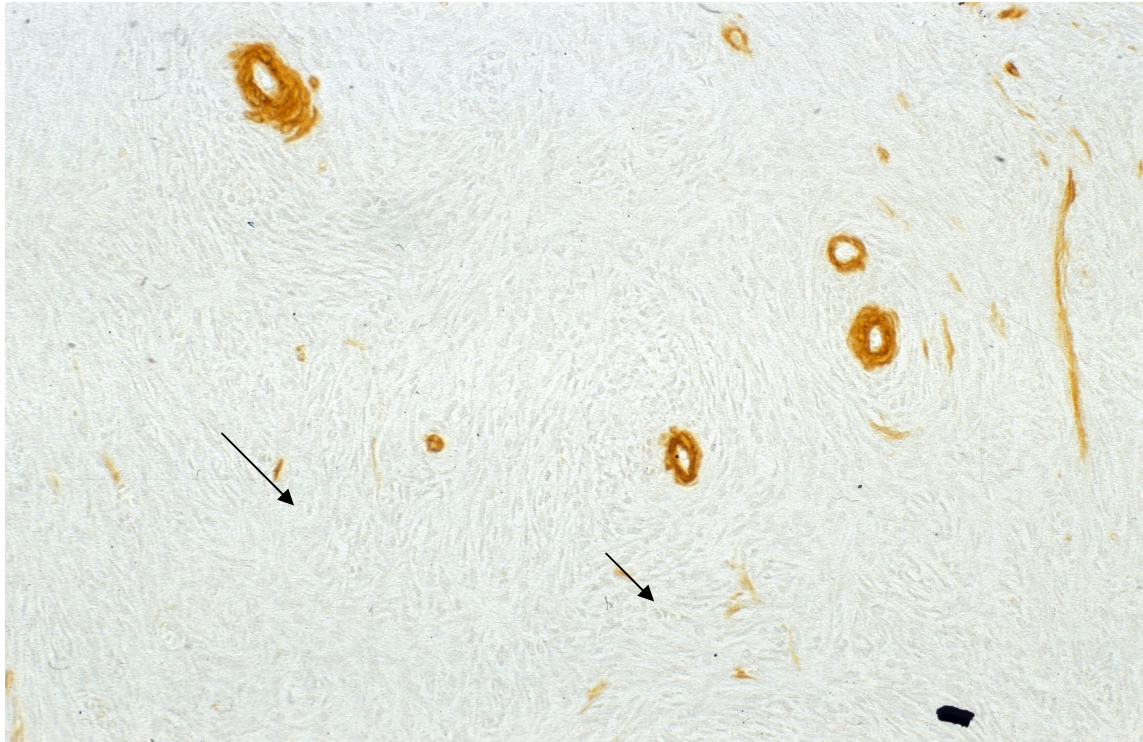
(5-11.tif) Färbung mit α -SMA, Rete ovarii, die positiv gefärbten Muskelzellen der ovariellen Gefäße sind deutlich zu erkennen



Auch die im Stroma vorkommenden glatten Muskelzellen zeigen eine Anfärbung. Sie liegen in Paketen aufeinander. In Relation zu der Häufigkeit von Fibrozyten finden sich jedoch deutlich weniger Glattmuskelzellen im ovariellen Stroma, des Weiteren lässt die Verteilung der Zellen im Stroma keine Unterschiede zwischen cortextnahen, eher bindegewebigen oder funktionellen Stromaanteilen zu (Abbildung 8).

Abbildung 8

(4-16.tif) Färbung mit α -SMA, Stroma im gesunden Ovar mit vereinzelt α -SMA positiven Zellen, Positivkontrolle durch Muskelzellen der Gefäßwände



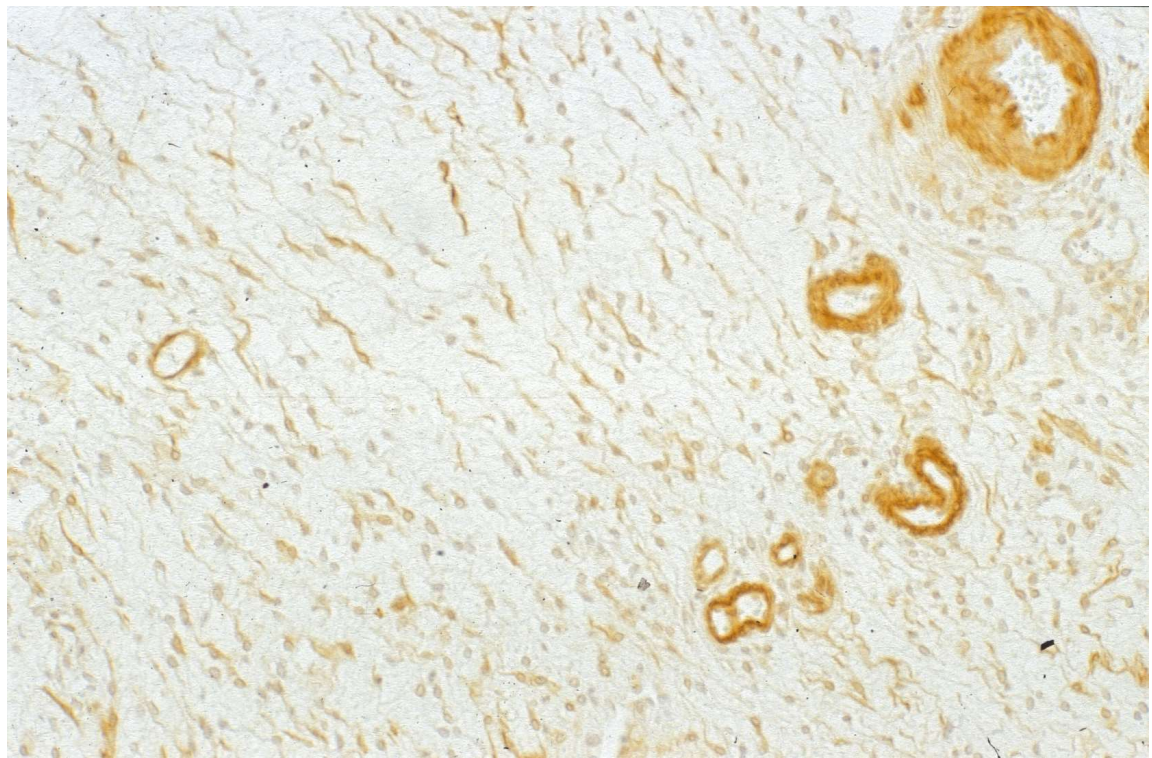
(4-17.tif) Färbung mit α -SMA, Stroma im gesunden Ovar



Allerdings zeigt sich in ödematösen Gewebsabschnitten eine erhöhte Anzahl α -SMA positiver Zellen (Abbildung 9)

Abbildung 9

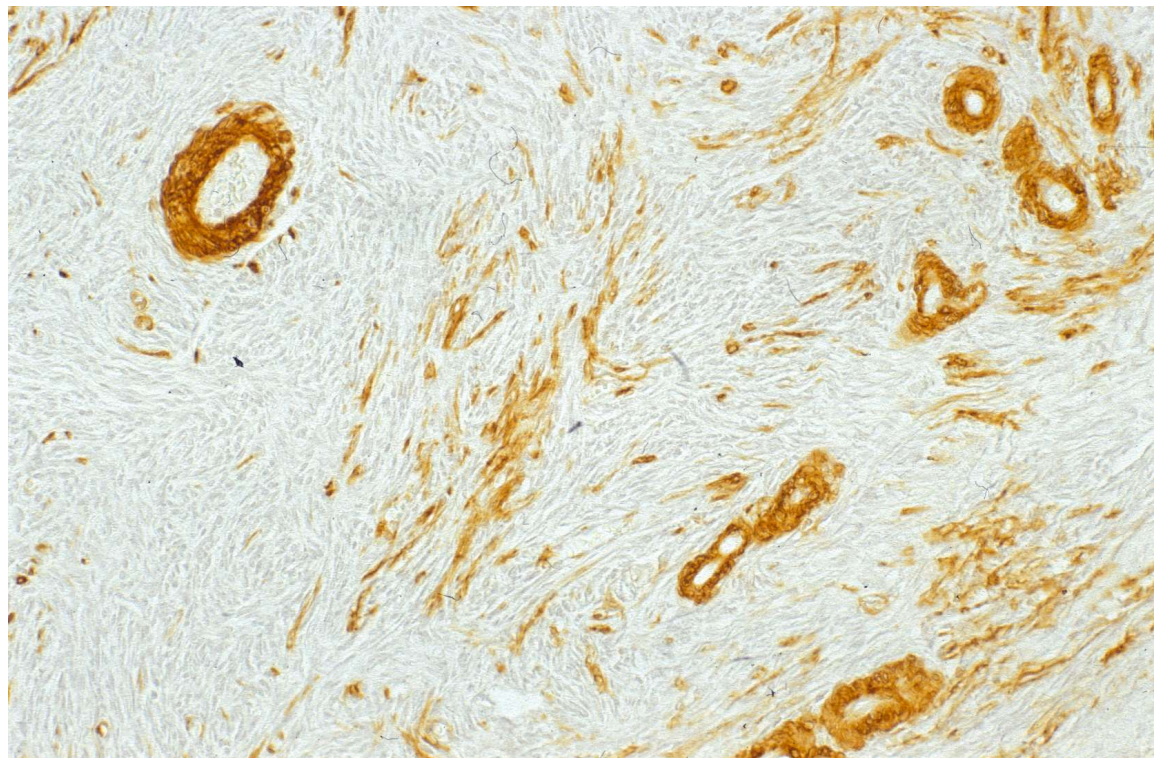
(4-15.tif) α -SMA positive Zellen in ödematösem Abschnitt des gesunden Ovars deutlich häufiger anzutreffen als in nicht-ödematösen (Vergleich mit Abbildung 8)



Die Morphologie der Zellen unterscheidet sich ebenfalls von der der oben beschriebenen Fibrozyten. Die glatten Muskelzellen imponierten plumper und kompakter, erkennbare Fortsätze fehlten. An Stellen gehäuftem Vorkommens bildeten die α -SMA positiven Zellen Wellenmuster (Abbildung 10).

Abbildung 10

(3-6.tif) Färbung mit α -SMA, plumpe Morphologie und wellenförmige Anordnung positiver Zellen im ovariellen Stroma



3.2.5 Immunhistochemie am gesunden Ovar, SPARC (Osteonectin)

Eine Positivkontrolle für die Anfärbung mit SPARC Antikörpern ist nicht so einfach möglich wie bei den vorher behandelten Färbungen.

Die Anfärbung von Endothelzellen liegt lediglich bei etwa 50%, was nur unzureichende Rückschlüsse erlaubt. Auch die allgemeine Intensität der Färbung stand deutlich hinter der von CD34 und α -SMA zurück.

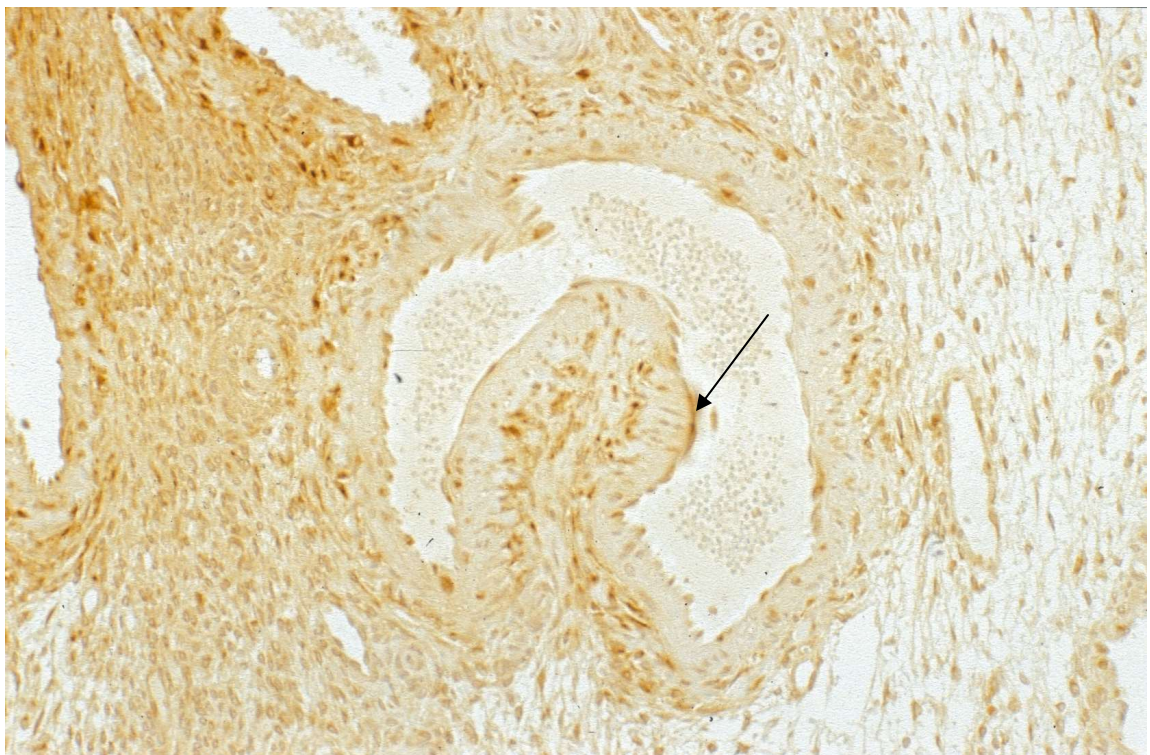
In einigen Präparaten findet sich eine Anfärbung des Endothels, in anderen wiederum nicht (Abbildung 11).

Abbildung 11

(4-19.tif) SPARC negative Endothelzellen



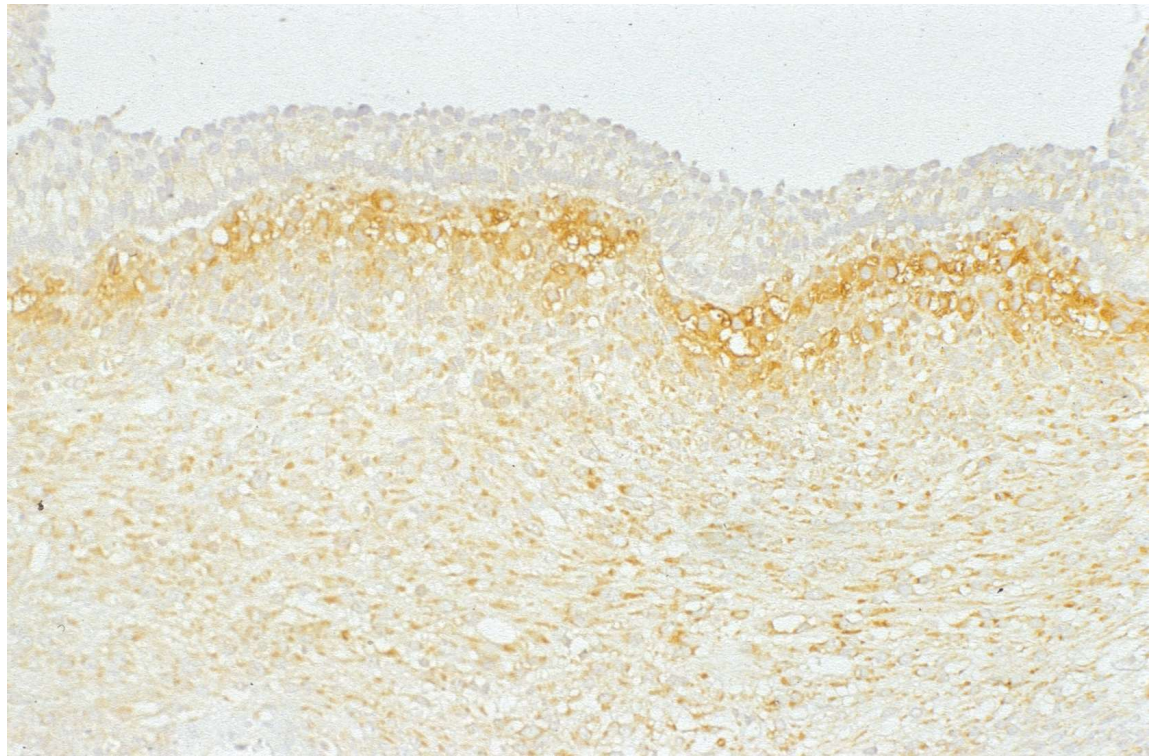
(5-13.tif) SPARC positive Endothelzellen



Im Stroma finden sich vereinzelt liegende SPARC positive Zellen, dennoch gibt es seltener Ansammlungen dieser Zellen, ein Beispiel hierfür ist der Saum SPARC positiver Zellen in unmittelbarer Nähe zum ovariellen Kortex (Abbildung 12).

Abbildung 12

(5-12.tif) SPARC positive Zellen im kortexnahen Stroma imponieren als dunkles Band

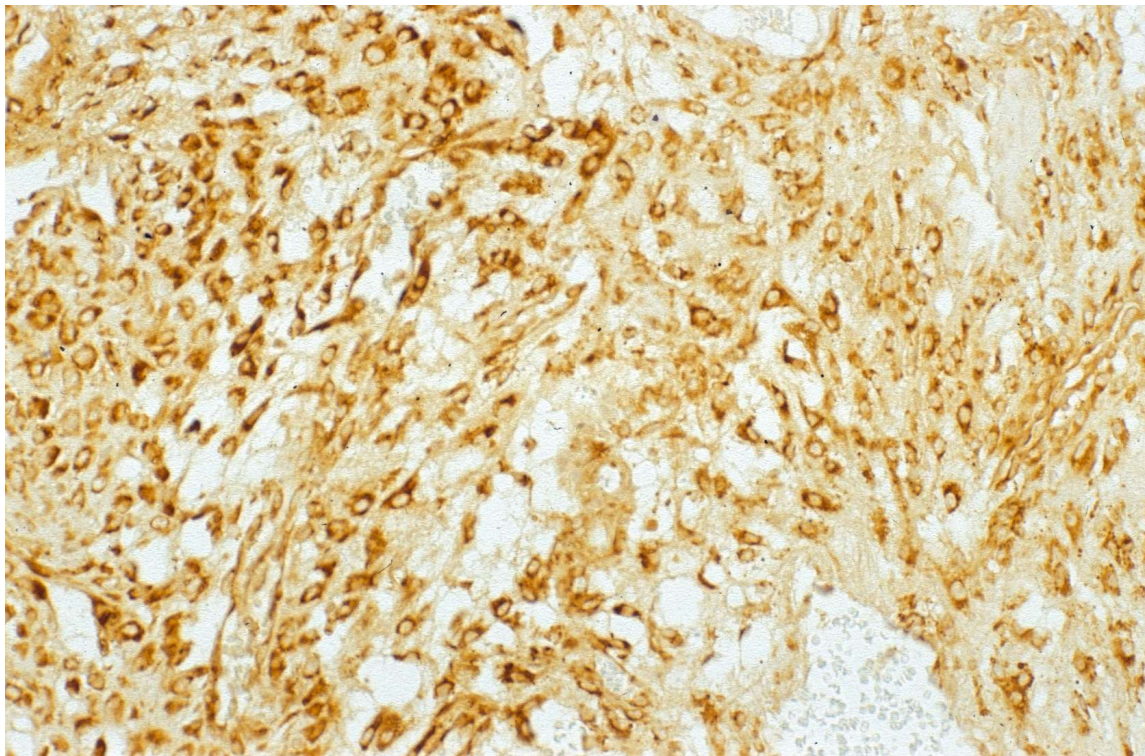


Die Morphologie der Zellen reicht von spindelförmig bis pyramidenförmig (in der Aufsicht wie ein gleichschenkliges Dreieck), was eine eindeutige Identifikation als ovarielle Fibrozyten nicht zulässt, aber eine Zuordnung zu dieser Zellpopulation erscheint wahrscheinlicher als die Einfügung zu den Myofibroblasten. Letzteres ist auch deshalb nicht wahrscheinlich, weil sich die Muskelschicht um die Gefäße in keinem Fall positiv anfärbt (Abbildung 13).

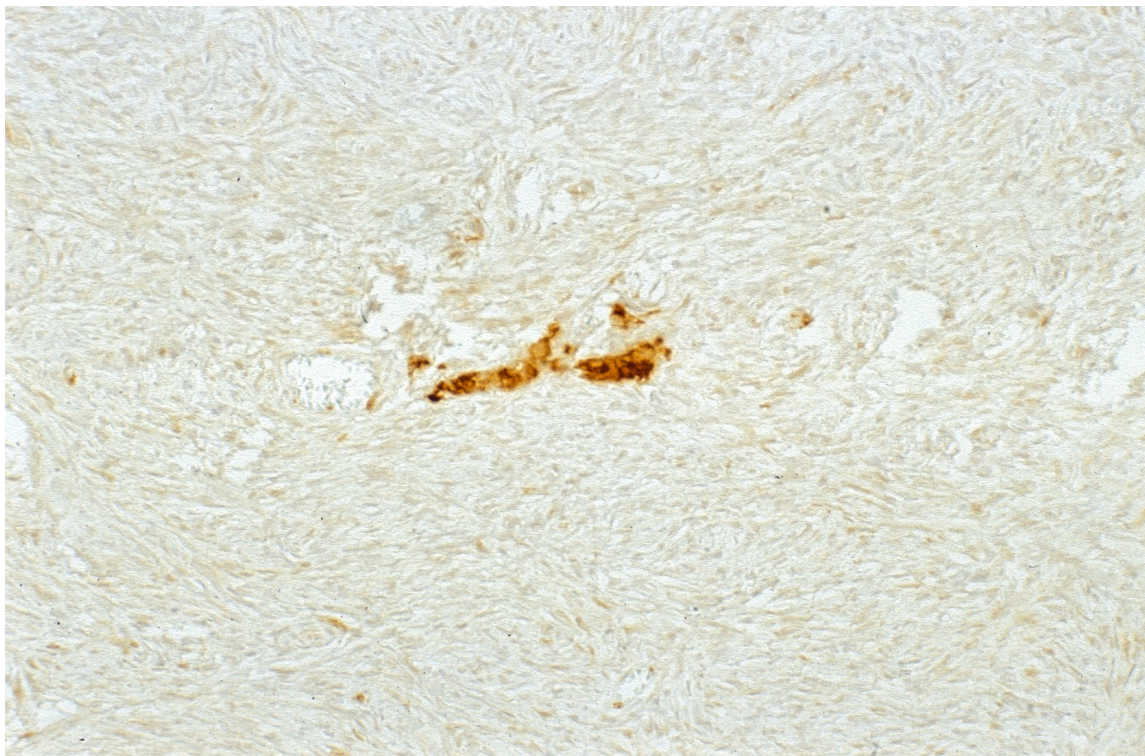
Neben den erwähnten zellulären Strukturen finden sich auch Kalkablagerungen, sogenannte Psammomabodies, die eine SPARC positive Färbereaktion zeigen.

Abbildung 13

(5-14.tif) Morphologie SPARC positiver Zellen im gesunden Ovar, unten rechts Gefäßanschnitt



(4-18.tif) SPARC positive Psammomabodies im gesunden Ovar



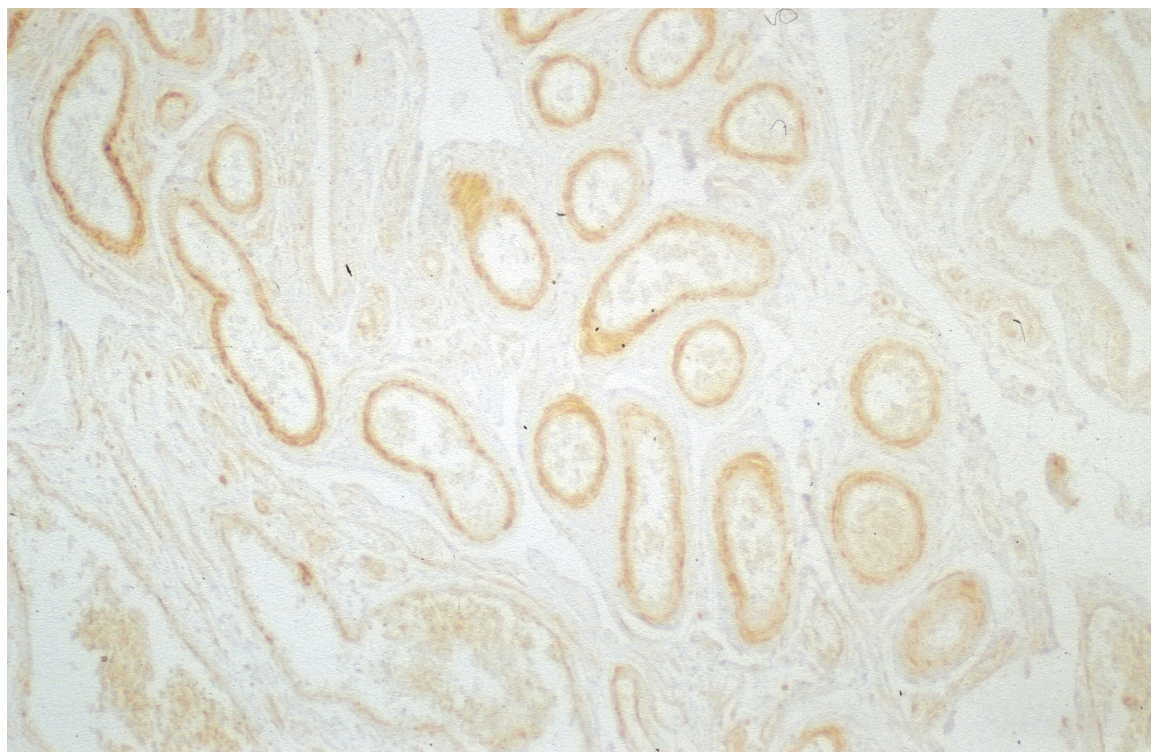
3.2.6 Immunhistochemie am gesunden Ovar, TGF- β -Rezeptor

Als Unterschied zu den vorherigen Färbungen und zudem als Positivkontrolle ist die deutliche Anfärbung von Endothelien im Ovar durch TGF- β -Rezeptor Antikörper zu werten.

Die Abbildung 14 zeigt eine Darstellung des Rete ovarii mit einer deutlichen Anfärbung der Endothelien durch TGF- β , das dazwischenliegende bindegewebliche Stroma zeigt keine positive Färbereaktion.

Abbildung 14

(5-17.tif) TGF- β Färbung des Rete ovarii, deutlich positiv reagierendes Endothel



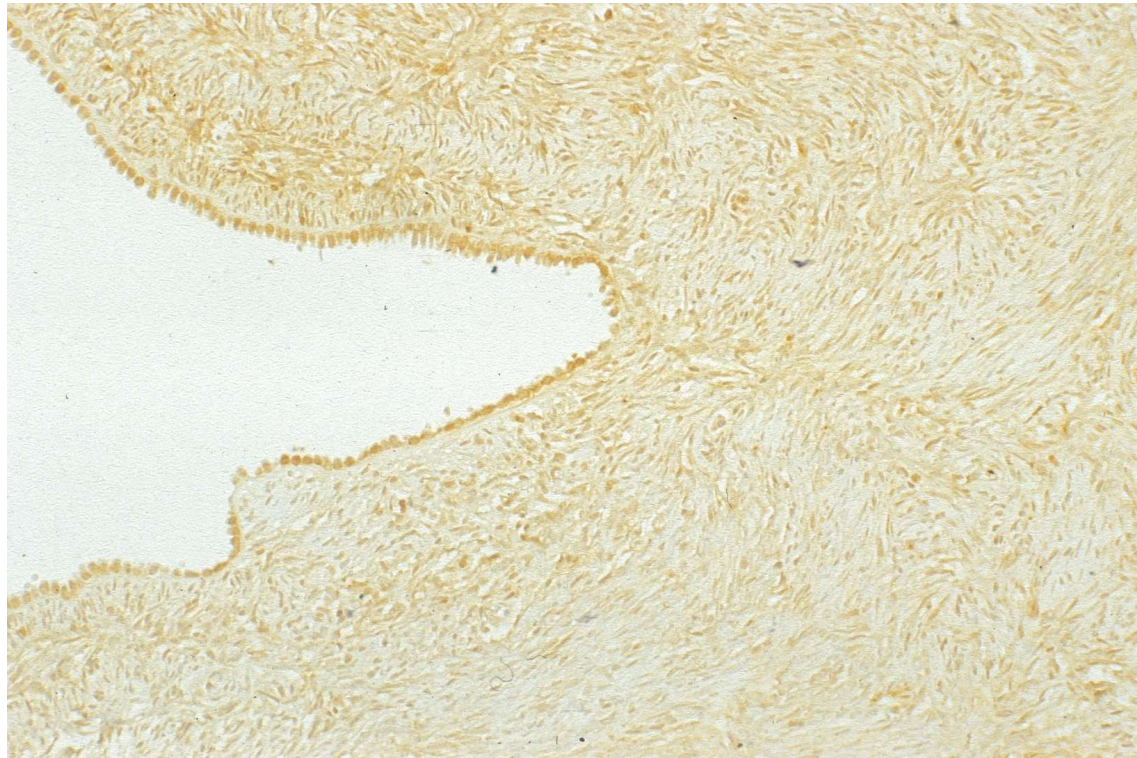
Einschränkend muss erwähnt werden, dass bei allen Präparaten die TGF- β -Färbung nicht so gut wie die vorhergehenden zu beurteilen war, da sich in den meisten Fällen eine diffuse Anfärbung aller Zellen zeigte. Nur die besonders intensiv angefärbten Zellen wurden deshalb zur Gruppe der positiven Färbereaktion zugeordnet.

Die im Rete ovarii liegenden Spindelzellen werden, wie oben erläutert, nicht durch die Färbung erfasst, ebenso wenig wie die die meisten Zellen des ovariellen Stromas. Wenn sich im Stroma positive Zellen fanden, so lagen sie meist einzeln und scheinbar zufällig angeordnet. Das Verteilungsmuster ließ keine Rückschlüsse auf spezielle ovarielle

Regionen zu. Auffällig hingegen war eine recht konstante Anfärbung von Epithelien (Abbildung 15). Die Morphologie der TGF- β -Rezeptor positiven Zellen kann als spindelförmig beschrieben werden.

Abbildung 15

(5-18.tif) Zellmorphologie TGF- β positiver Zellen im Stroma und im Epithel des gesunden Ovars mit spindelförmigen Charakter



3.3 papillär-seröse Zystadenofibrome

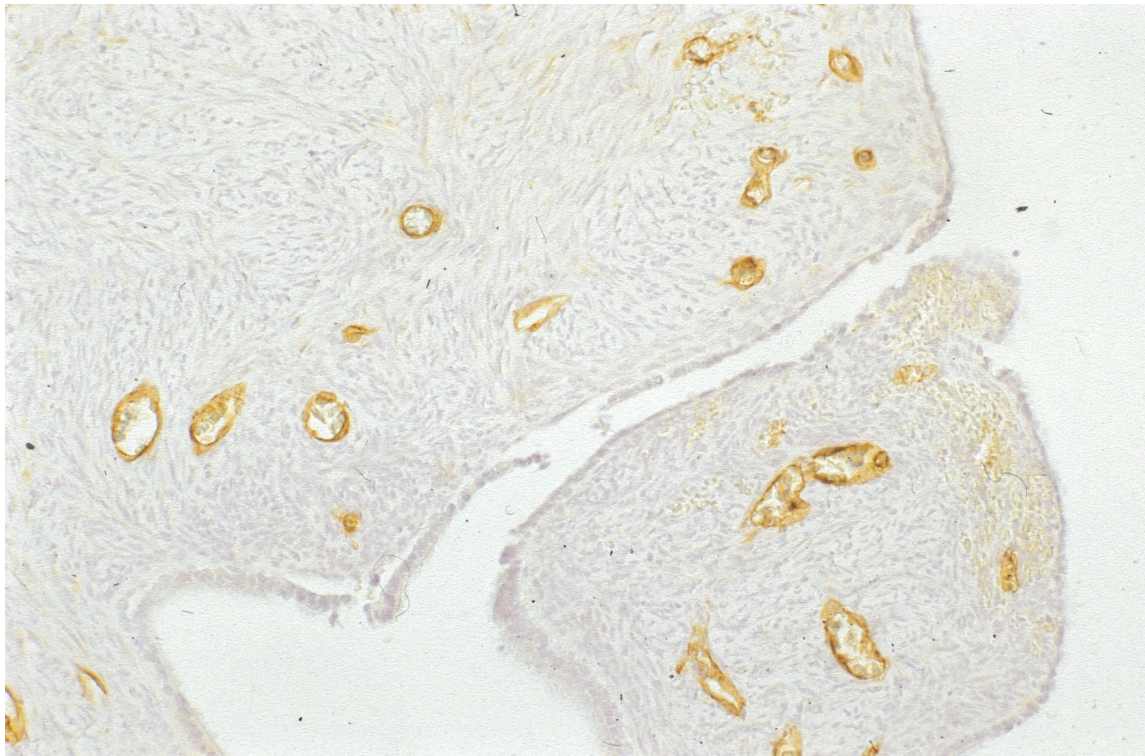
Die Diagnose eines gutartigen Zystadenofibrom des Ovars lässt sich mikroskopisch durch die gehäuft vorkommenden Zysten sowie dem Vorliegen von - meist ödematös aufgetriebenen - Papillen treffen. Dabei treten im Epithel der Zysten gelegentlich Dysplasien auf, die aber im Gegensatz zu den papillär-serösen Ovarialkarzinomen noch nicht die Kriterien für Malignität erfüllen.

Bei dieser benignen Veränderung des Ovars ist vor allem das Anfärbeverhalten der vorkommenden o.g. pathologischen Veränderungen von Interesse, da davon auszugehen ist, dass aufgrund der Benignität der Erkrankung das an den Veränderungen unbeteiligte ovarielle Stroma ebenso auf die Färbungen reagiert wie im gesunden Ovar.

Diese Vermutung lässt sich bestätigen. Auch bei der hier beschriebenen Veränderung zeigen sich die Fibrozyten des ovariellen Stromas überwiegend CD34 negativ, wie der Abbildung 16 zu entnehmen ist.

Abbildung 16

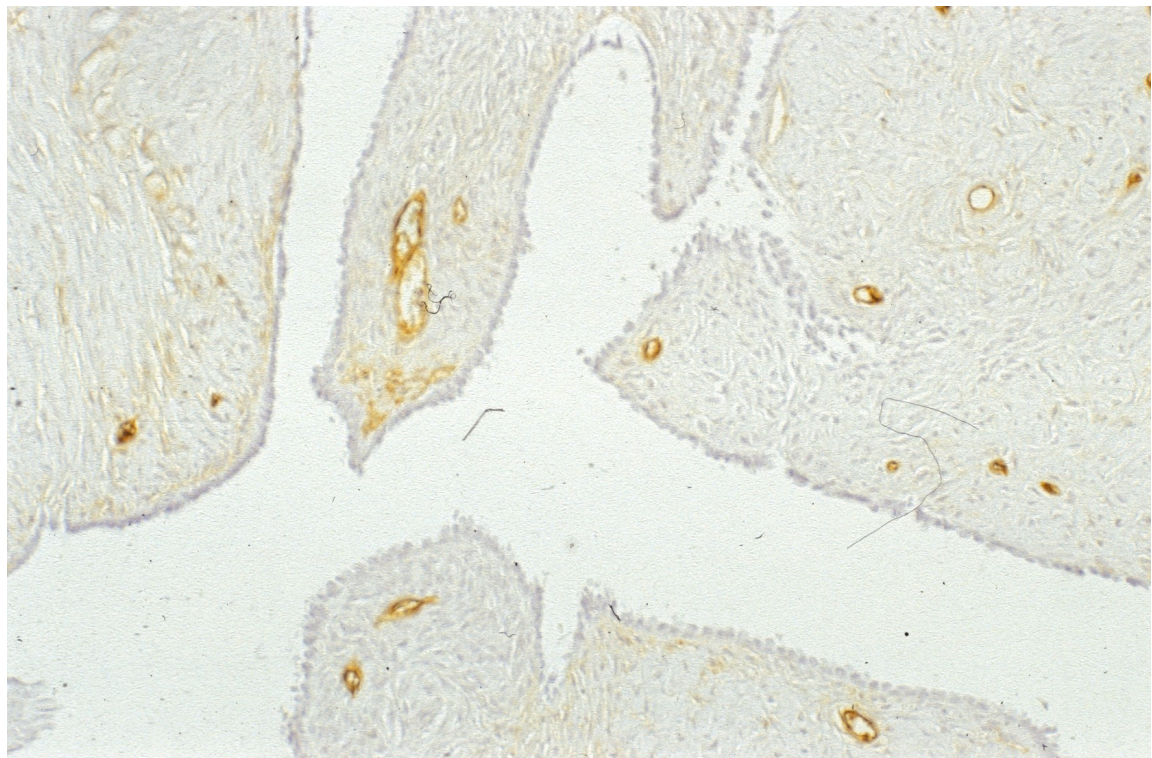
(5-4.tif) CD 34 negatives Stroma im papillär-serösen Zystadenofibrom



Ebenso CD34 negativ imponieren die Epithelien der Zysten und das den Zysten direkt anliegende perizystische Stroma (Abbildung 17).

Abbildung 17

(5-1.tif) CD34 negatives Zystenepithel und perizystisches Stroma im papillär-serösen Zystadenofibrom, Positivkontrolle durch Endothel



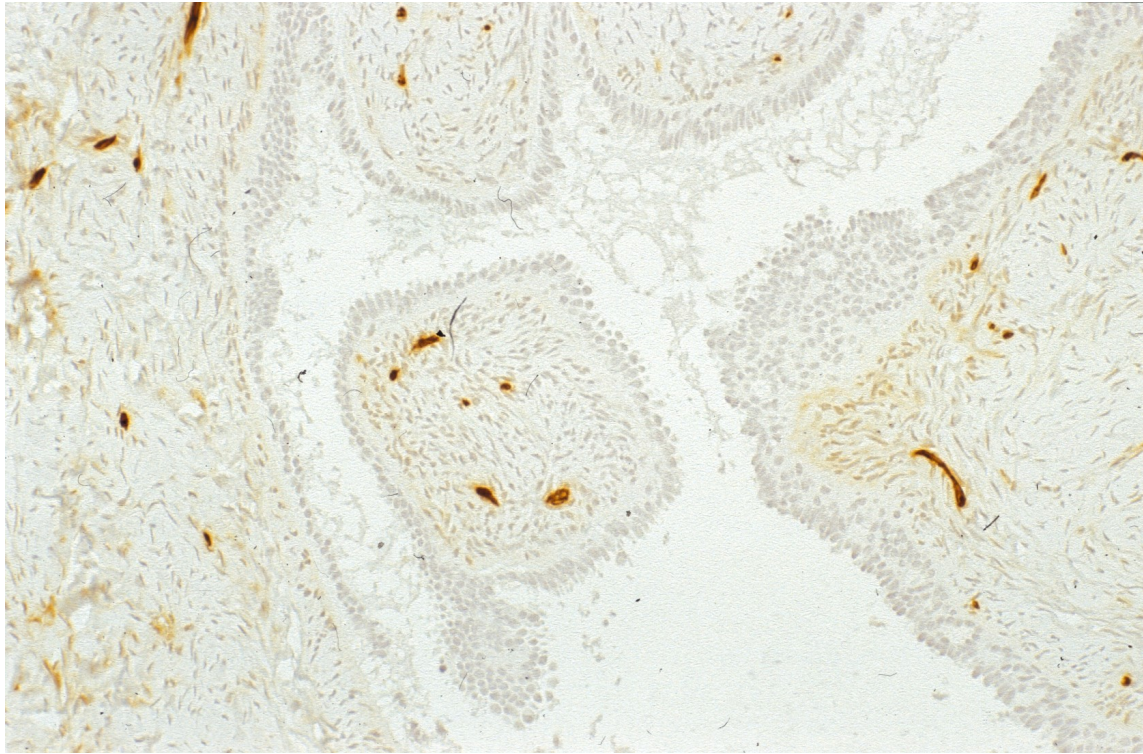
Auch die Ergebnisse für die Anfärbung mit TGF- β , SPARC und α -SMA ergaben keine Unterschiede zu den schon beim gesunden Ovar gemachten Beobachtungen.

Um dies zu veranschaulichen, zeigt die folgende Abbildung 18 den gleichen Abschnitt eines Ovars in drei unterschiedlichen Färbungen. Die Zystenepithelien sind in allen drei Fällen nicht angefärbt, bei der Färbung mit SPARC kommt es zur bereits erwähnten diffusen Anfärbung.

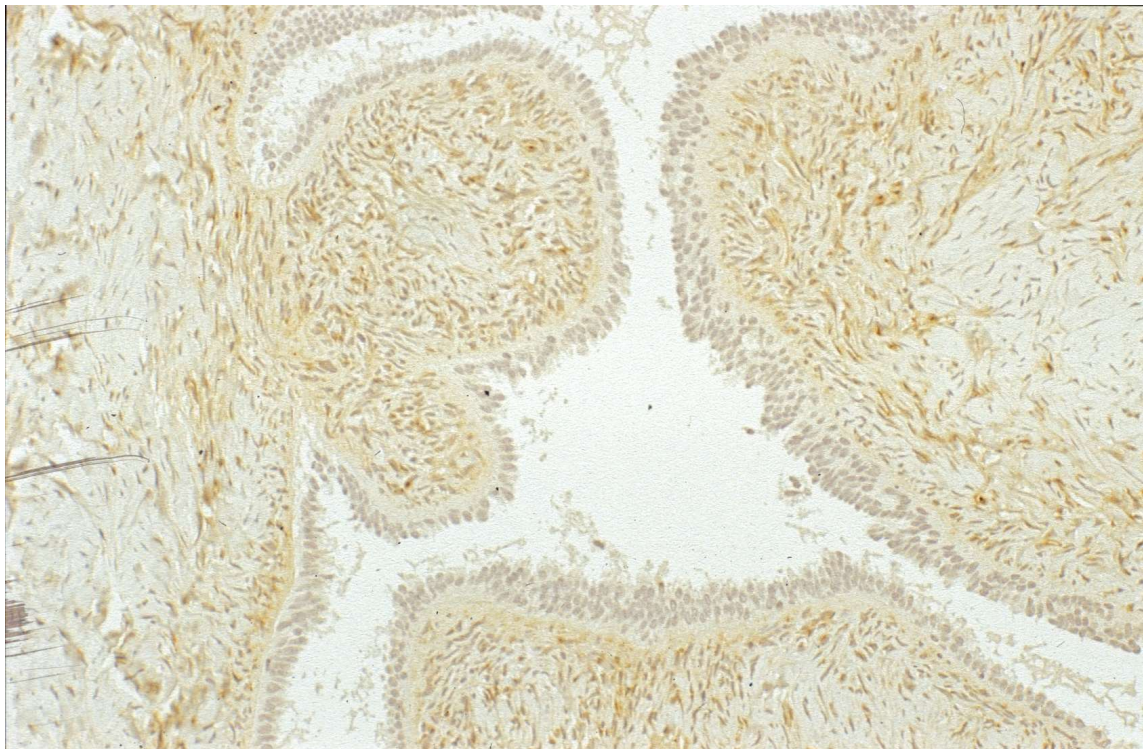
Interessant ist die ödematöse Papille (oben in der Mitte) in der Färbung mit SMA, ein eindeutig positives Ergebnis. Auf dieses Phänomen wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

Abbildung 18

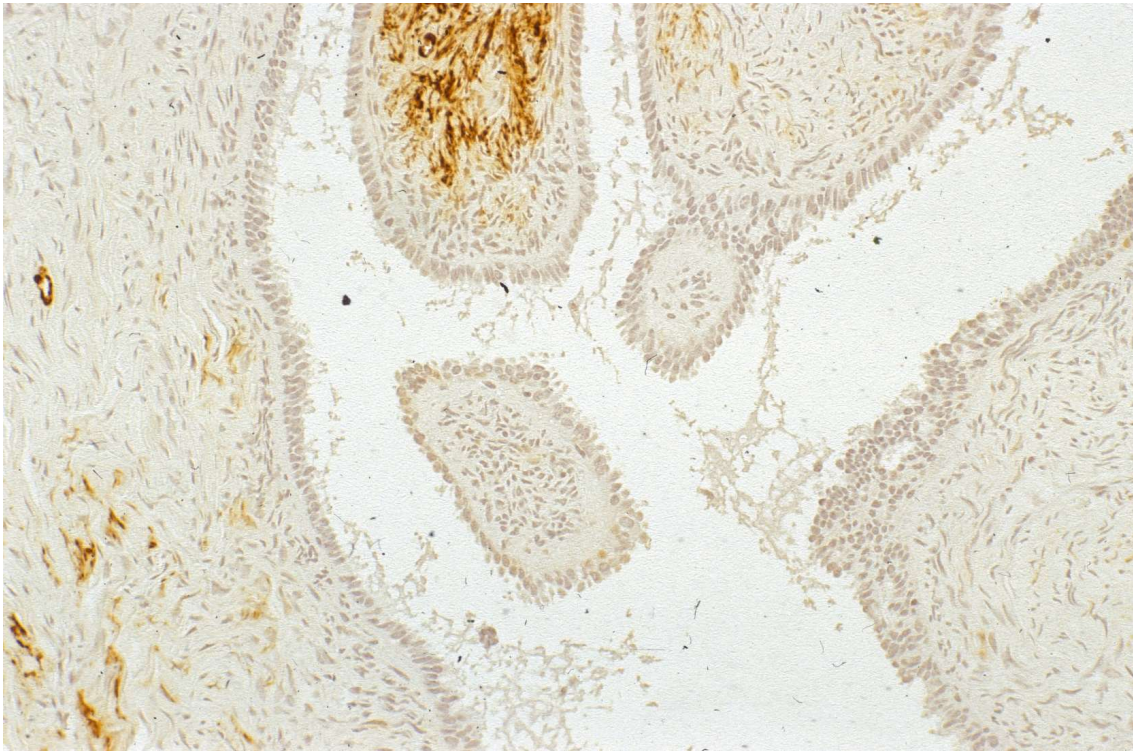
(5-9.tif) CD34 im Stroma eines papillär-serösen Zystadenofibroms.



(5-8.tif) SPARC im Stroma eines papillär-serösen Zystadenofibroms



(5-10.tif) SMA im Stroma eines papillär-serösen Zystadenofibroms, auffällig die ödematöse Papille



3.3.1 Ödematöse Papillen

Auffällig ist das Anfärbeverhalten der ödematös aufgetriebenen Papillen. In diesen Bereichen ist die stromale Struktur durch Flüssigkeitseinlagerungen aufgelockert und die Adhäsion der Stromazellen untereinander, also auch die der Fibrozyten, größtenteils aufgehoben.

Während die Färbung mit CD34 in der überwältigenden Mehrheit der Fälle negativ ausfällt, zeigt sich eine deutliche Anfärbung von α -SMA positiven Myofibroblasten in den beschriebenen Regionen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse aller Färbungen an papillär-serösen Zystadenofibromen unterstreicht diese Beobachtung (Abbildung 19).

In den folgenden Abbildungen 20 und 21 werden jeweils eine Färbung mit CD34 und eine mit α -SMA gegenübergestellt, die exakt an der gleichen Stelle des Ovars fotografiert wurden.

Neben der eindeutig positiven Reaktion in den ödematösen Gewebeabschnitten für α -SMA zeigt sich, dass das weniger aufgelockerte Stroma α -SMA negativ ist.

Die Färbungen für CD34 hingegen sind durchgehend negativ.

Die Doppelfärbung mit CD34 und TGF- β bestätigt ebenfalls die letztgenannte Aussage.

Abbildung 19

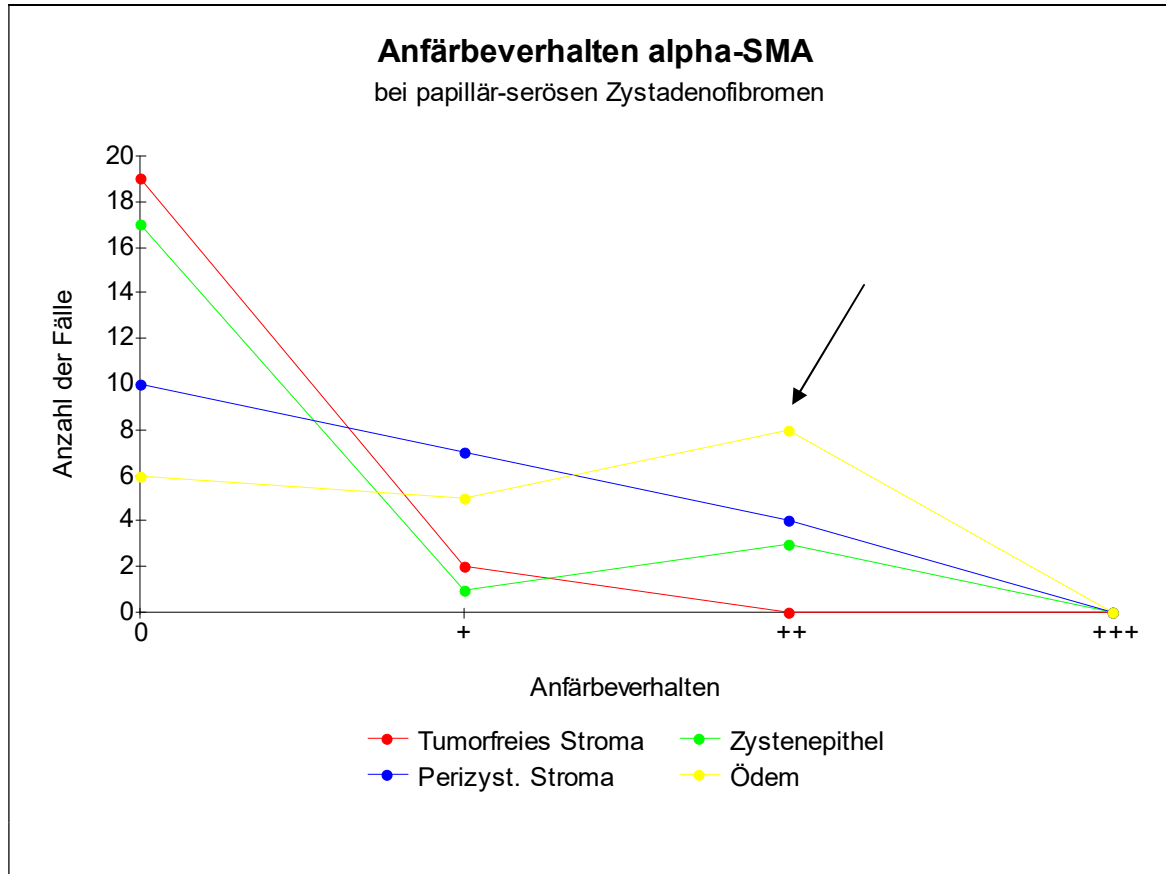
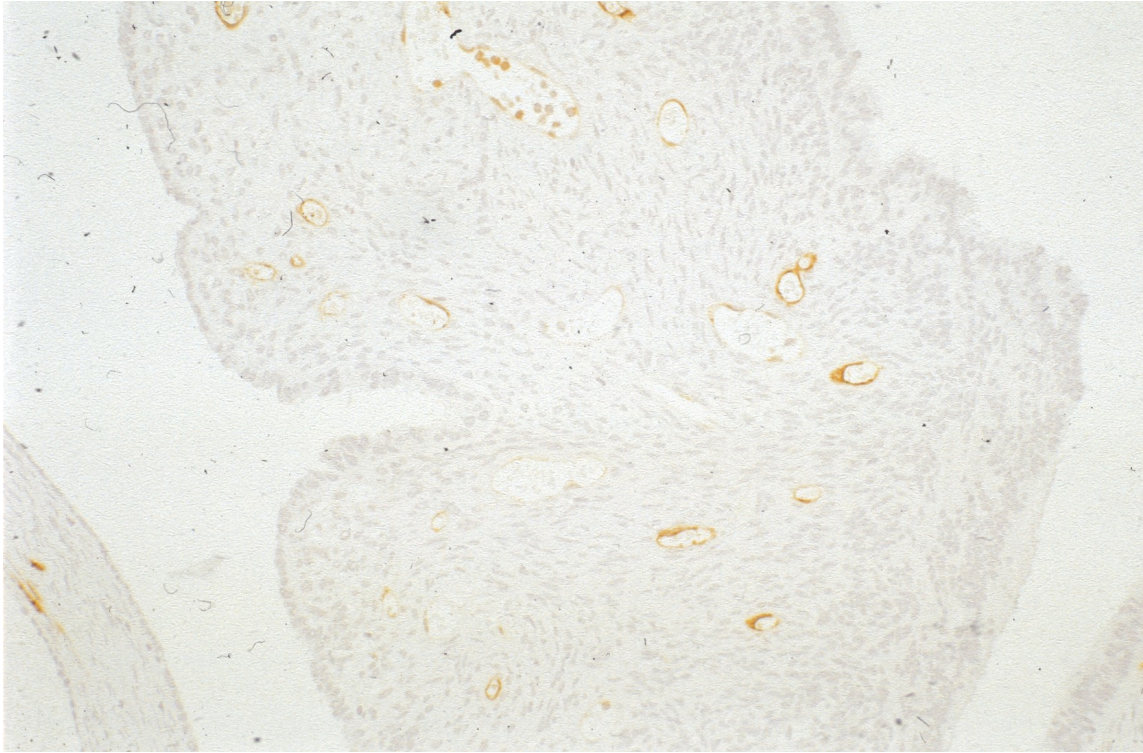
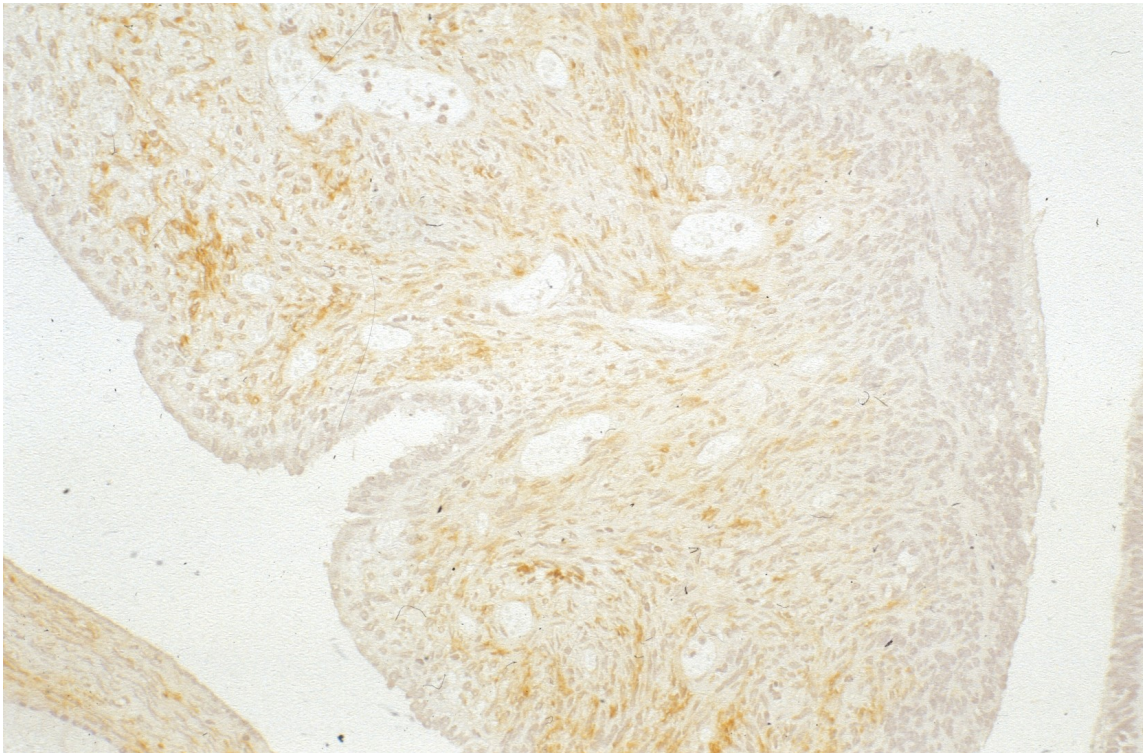


Abbildung 20

(1-5.tif) CD34 in ödematöser Papille beim papillär-serösen Zystadenofibrom



(1-6.tif) α -SMA in ödematöser Papille beim papillär-serösen Zystadenofibrom



(3-15.tif) Doppelfärbung CD34 (grün) und TGF- β (rot) in ödematöser Papille beim papillär-serösen Zystadenofibrom

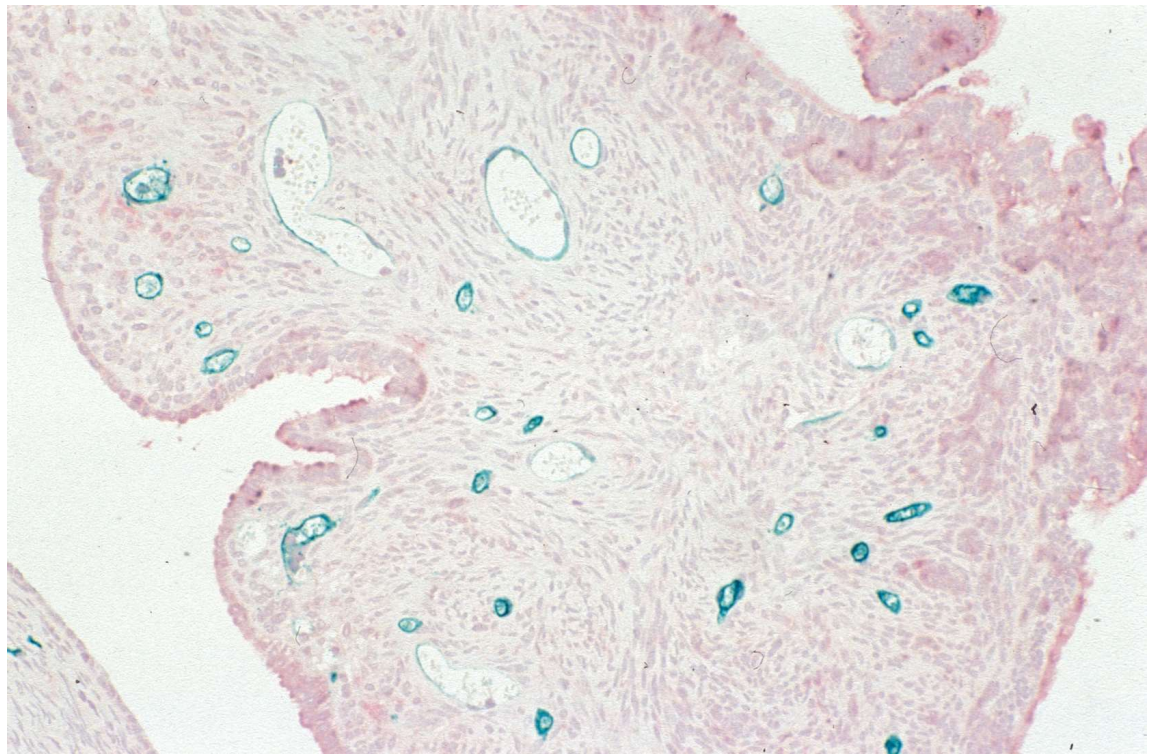
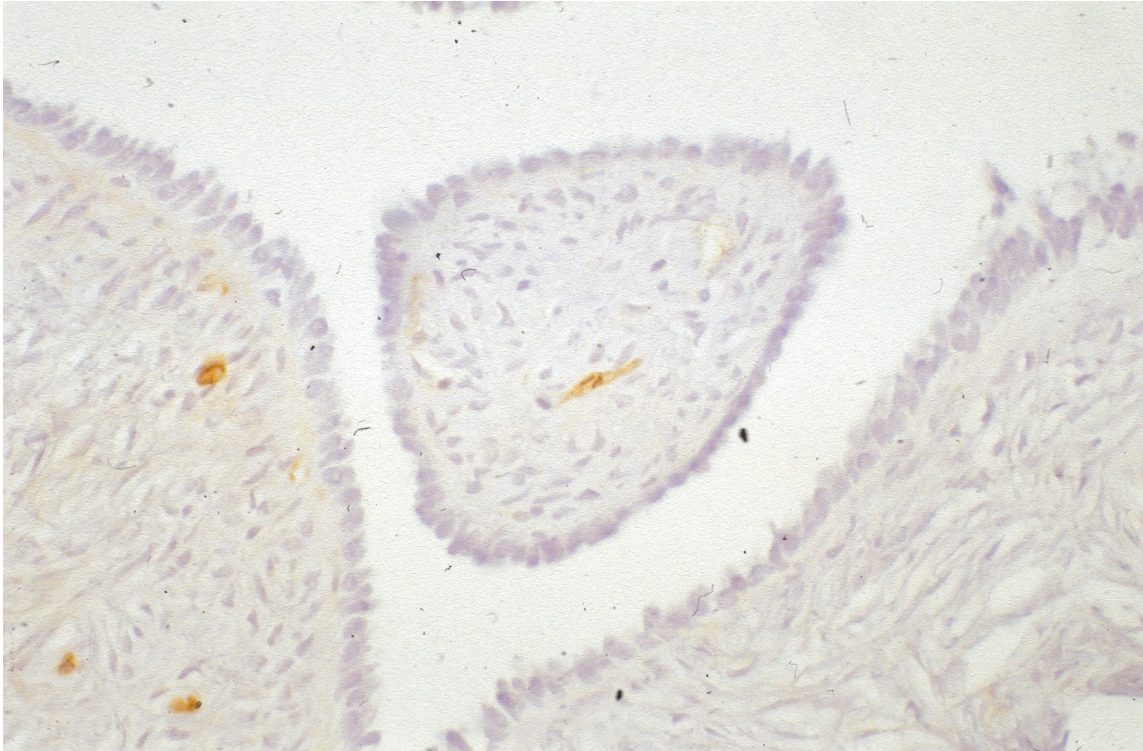


Abbildung 21

(1-7.tif) CD34 in ödematöser Papille beim papillär-serösen Zystadenofibrom



(1-8.tif) α -SMA in ödematöser Papille beim papillär-serösen Zystadenofibrom



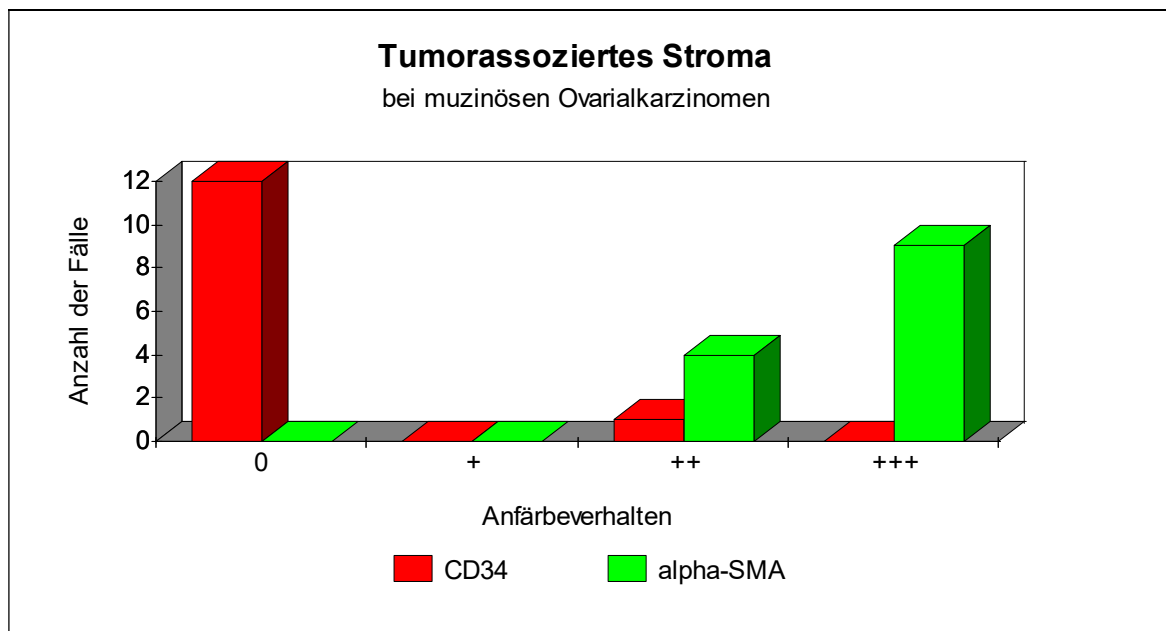
3.4 muzinöse Ovarialkarzinome

Muzinöse Ovarialkarzinome sind maligne Tumoren, die sich durch das Vorkommen muzinhaltiger Strukturen charakterisieren.

Die Annahme, dass sie sich im Färbeverhalten nicht deutlich von den papillär-serösen Ovarialkarzinomen unterscheiden, kann nicht bestätigt werden. Es findet sich vielmehr ein, im Vergleich zu den vorhergehend beschriebenen Ergebnissen, komplexes Anfärbemuster.

Die folgende Abbildung zeigt das unterschiedliche Anfärbeverhalten für CD34 und α -SMA beim tumorassoziierten Stroma in muzinösen Ovarialkarzinomen. Auffallend ist vor allem die deutliche Positivität für α -SMA, die in dieser Form bei den ebenfalls malignen papillär-serösen Ovarialkarzinomen nicht nachgewiesen wird (Abbildung 22).

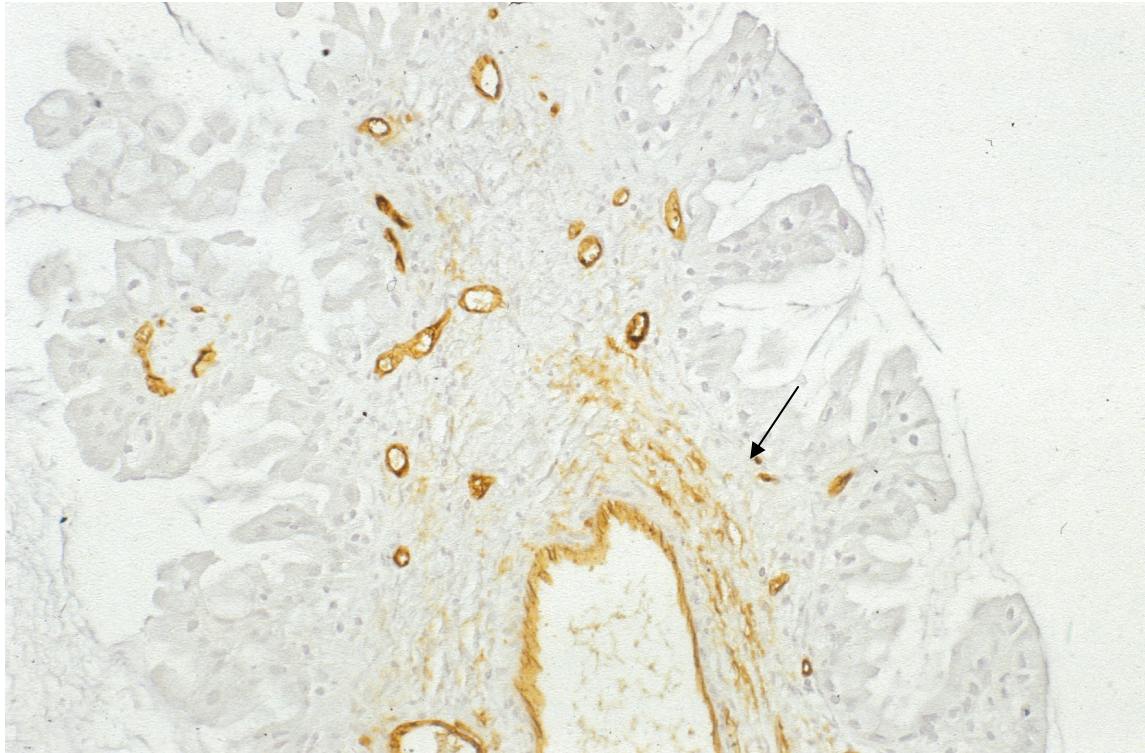
Abbildung 22



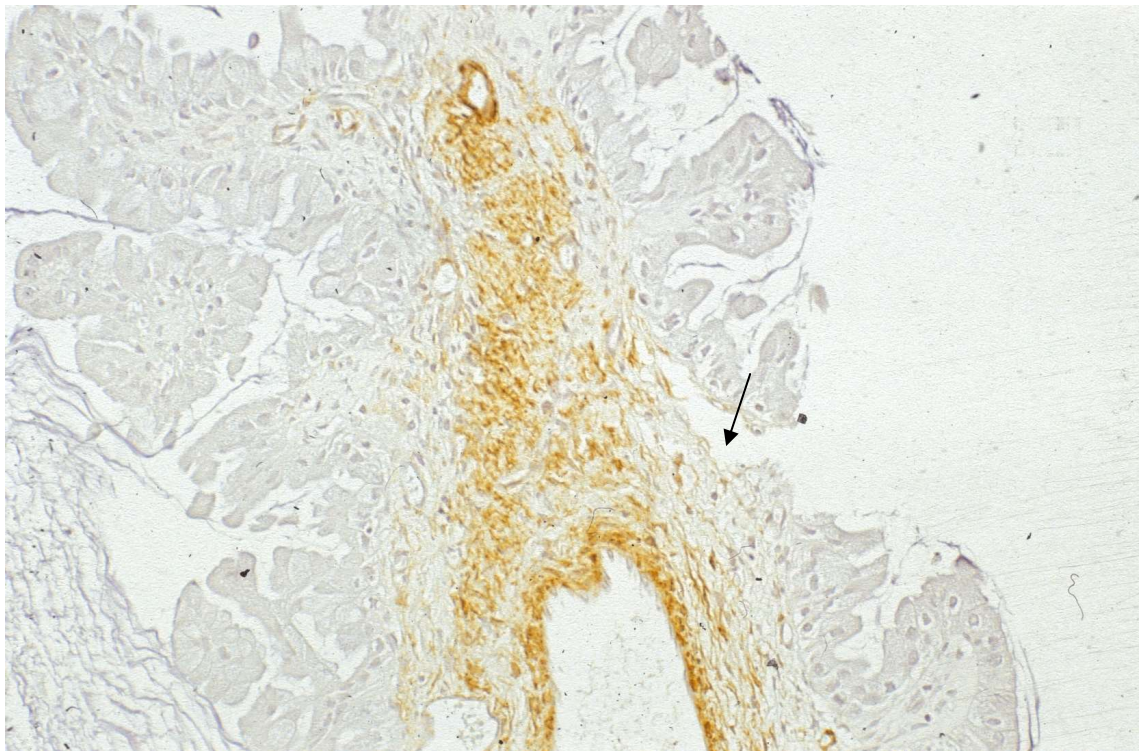
Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils denselben Ausschnitt eines Präparats in den unterschiedlichen Färbungen. Besonders deutlich tritt auch hier der Unterschied zwischen CD34 und α -SMA zu Tage (Abbildung 23). Dabei werden diejenigen Regionen, die neben CD34 positiven Endothelien auch CD34 positive Fibrozyten aufweisen in der Färbung mit α -SMA ausgespart (Pfeile).

Abbildung 23

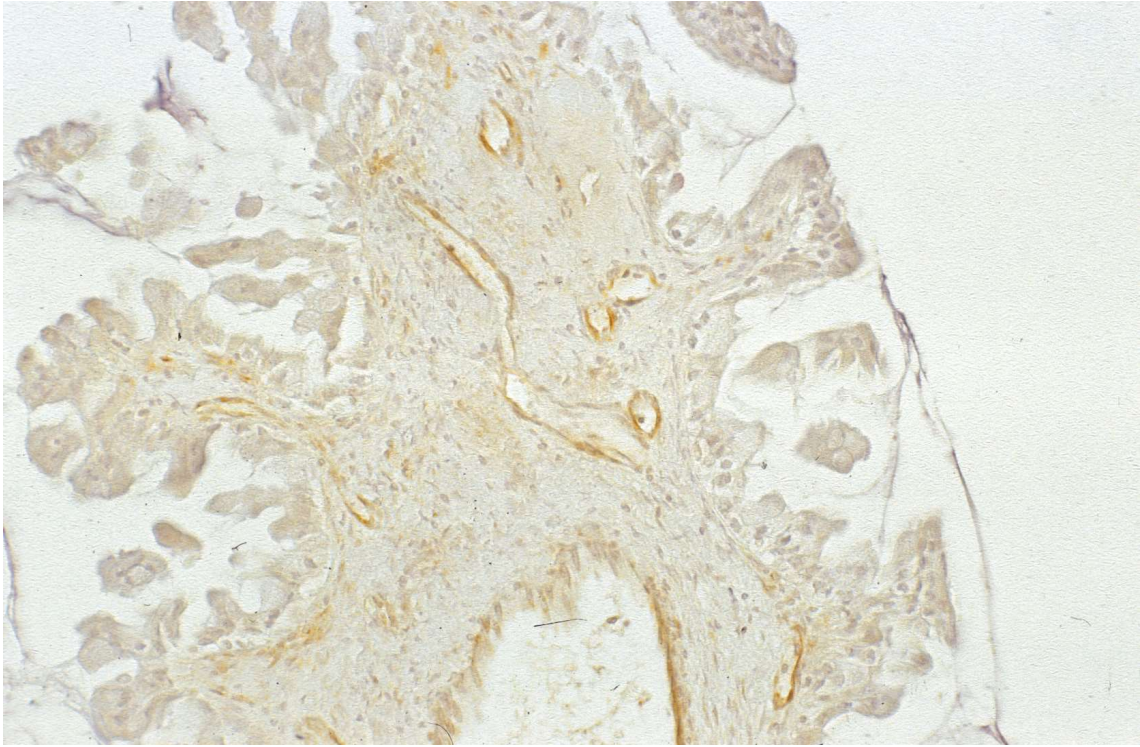
(2-24.tif) CD34 Färbung in einer Papille muzinösen Ovarialkarzinoms, vergleiche die jeweils mit Pfeil markierte Region



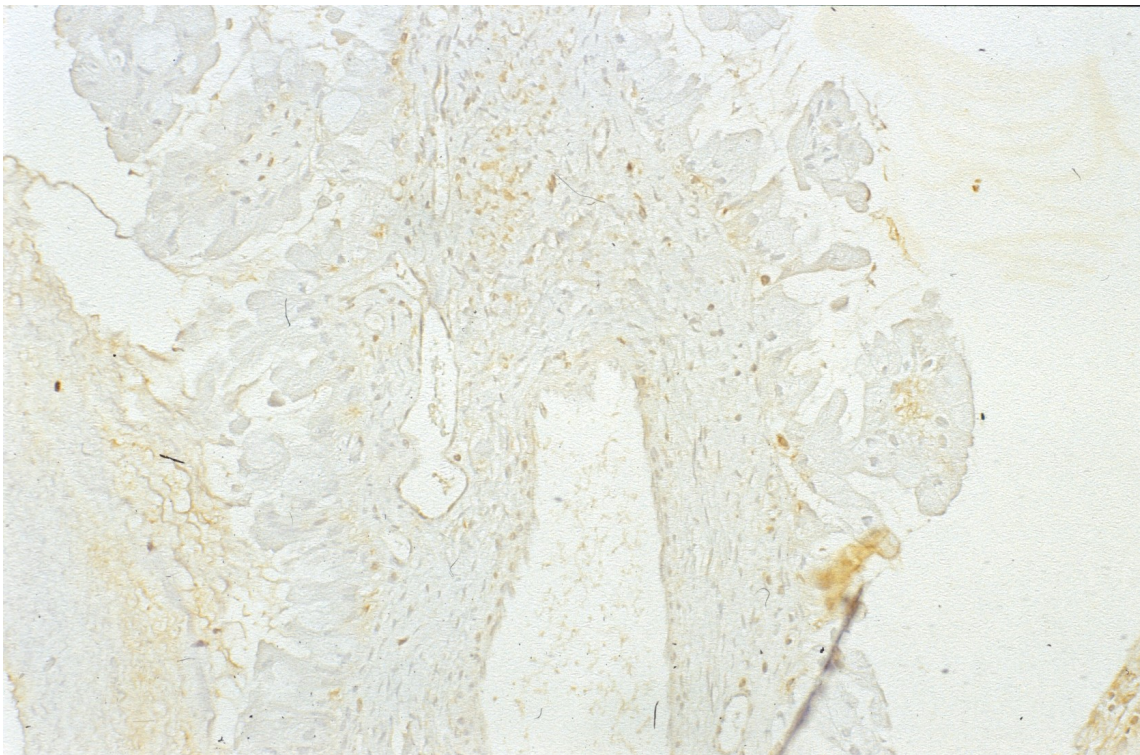
(2-25.tif) α -SMA Färbung in einer Papille muzinösen Ovarialkarzinoms



(4-7.tif) SPARC Färbung in einer Papille muzinösen Ovarialkarzinoms



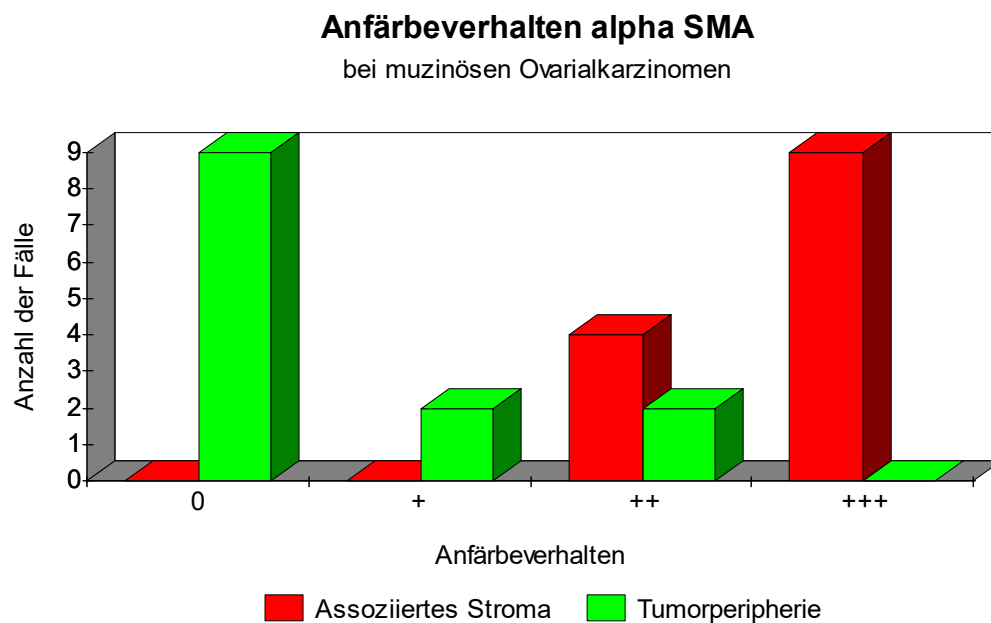
(4-8.tif) TGF- β Färbung in einer Papille muzinösen Ovarialkarzinoms



Die Färbungen mit SPARC und TGF- β zeigen keine Unterschiede in der betrachteten Region.

Besonders deutlich wird das unterschiedliche Anfärbeverhalten zwischen Tumorperipherie und tumorassoziiertem Stroma in der Abbildung 24 dargestellt.

Abbildung 24



Von dieser Zusammenfassung ausgehend beschreibt die Abbildung 25 am Einzelfall das beschriebene Anfärbemuster.

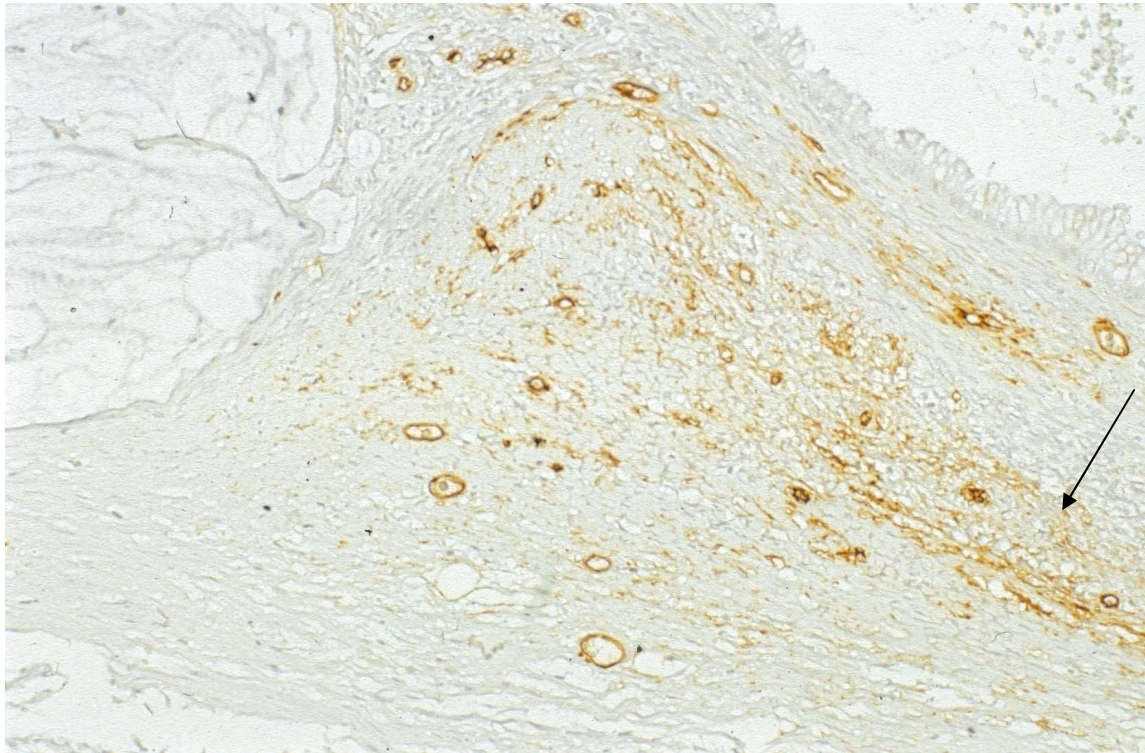
Areale, die besonders positiv auf CD34 reagieren, werden in der Färbung mit α -SMA wie oben bereits beschrieben, ausgelassen und sind mit Pfeilen markiert.

Der durch den Tumor infiltrierte Bereich in der Bildmitte ist wesentlich positiver für α -SMA als für CD34, während sich die Randbezirke wenn überhaupt nur mit CD34 anfärben und aufgrund ihrer Struktur am ehesten bindegewebigen Stroma entsprechen, das mit einer scharfen Grenze von den α -SMA positiven Zellen des Tumors getrennt ist. Auch die Färbung mit SPARC –Antikörpern empfindet diese Gliederung nach, während die Anfärbung für TGF- β unspezifisch ist.

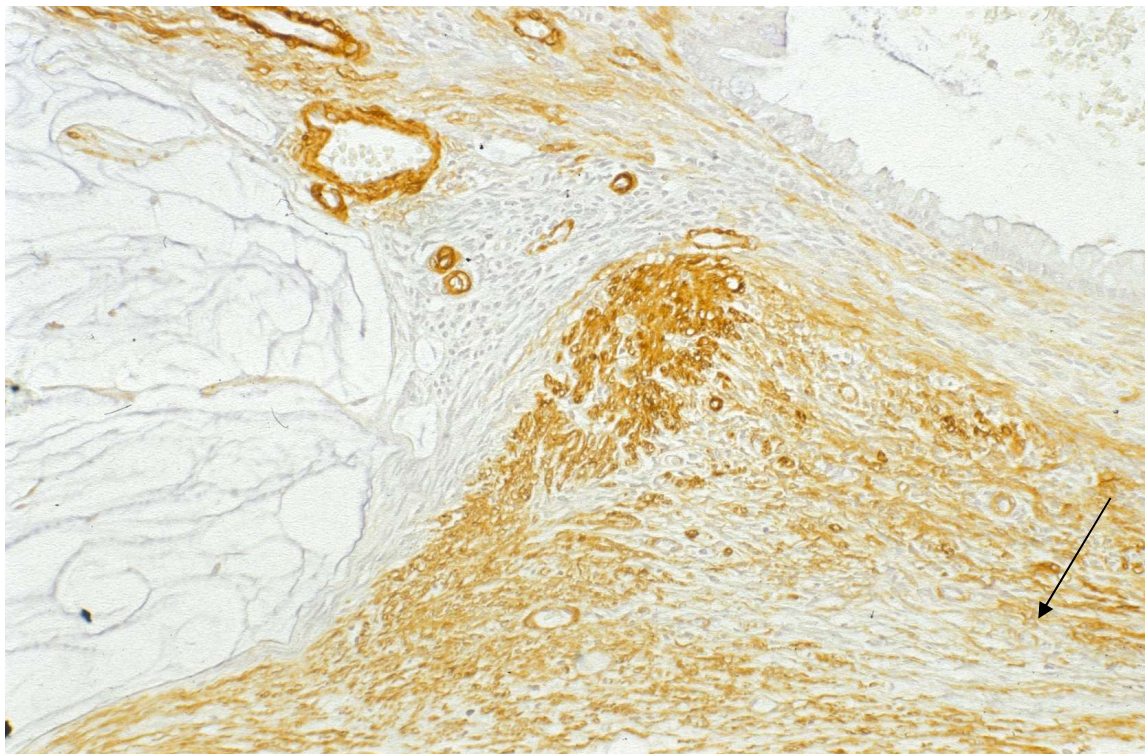
Abbildung 26 zeigt ein ähnliches Beispiel. Der schmale Zapfen gesunden Stromas ist von malignem dysplastischen Epithelien umgeben, stellt also tumorassoziiertes Stroma dar und ist negativ für CD34, während er deutlich positiv für α -SMA wird. Das tumoröse Gewebe hingegen ist eindeutig α -SMA negativ (Tumorperipherie).

Abbildung 3.26

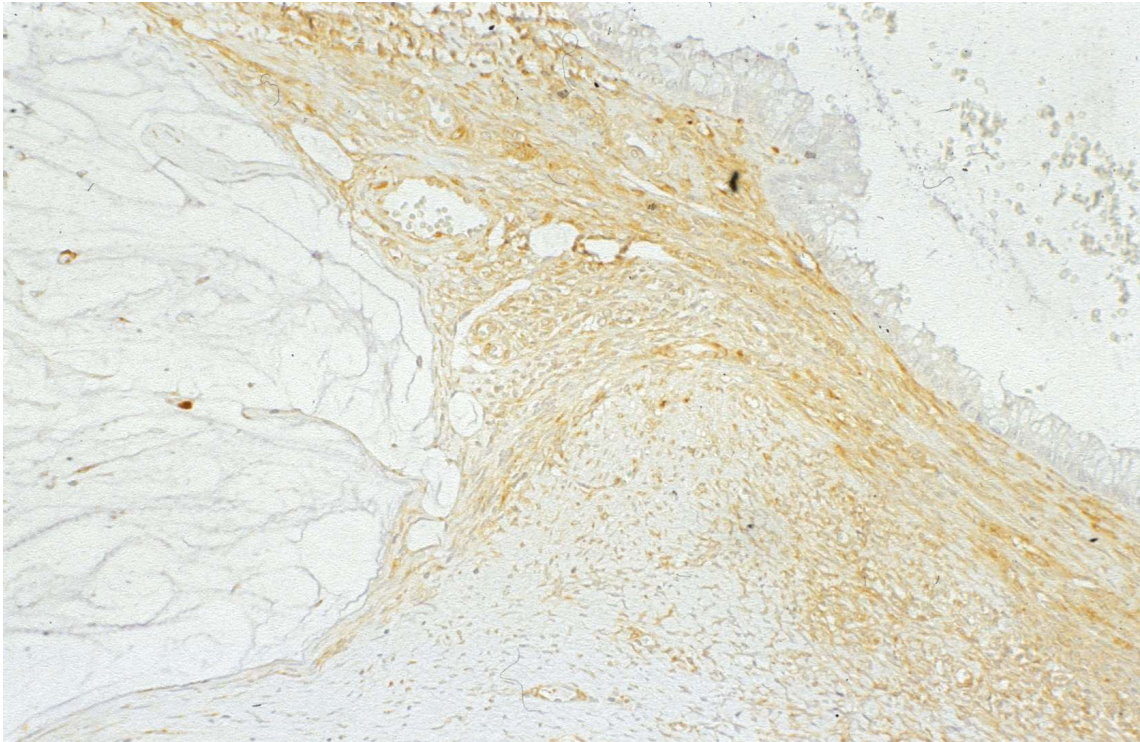
(2-17.tif) CD34 Färbung eines muzinösen Ovarialkarzinoms, bezeichnete Region positiv



(2-18.tif) α -SMA Färbung eines muzinösen Ovarialkarzinoms, gleiche Region, negativ



(4-1.tif) SPARC Färbung eines muzinösen Ovarialkarzinoms, diffuse Anfärbung



(4-2.tif) TGF- β Färbung eines muzinösen Ovarialkarzinoms, diffuse Anfärbung

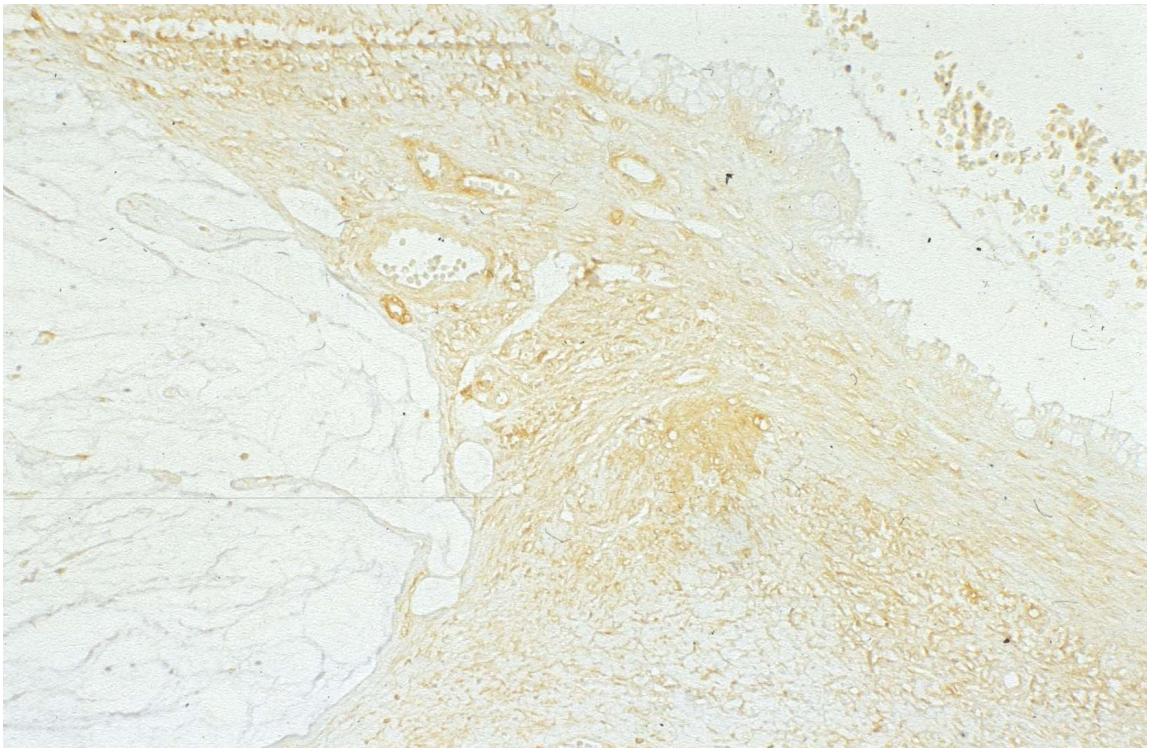
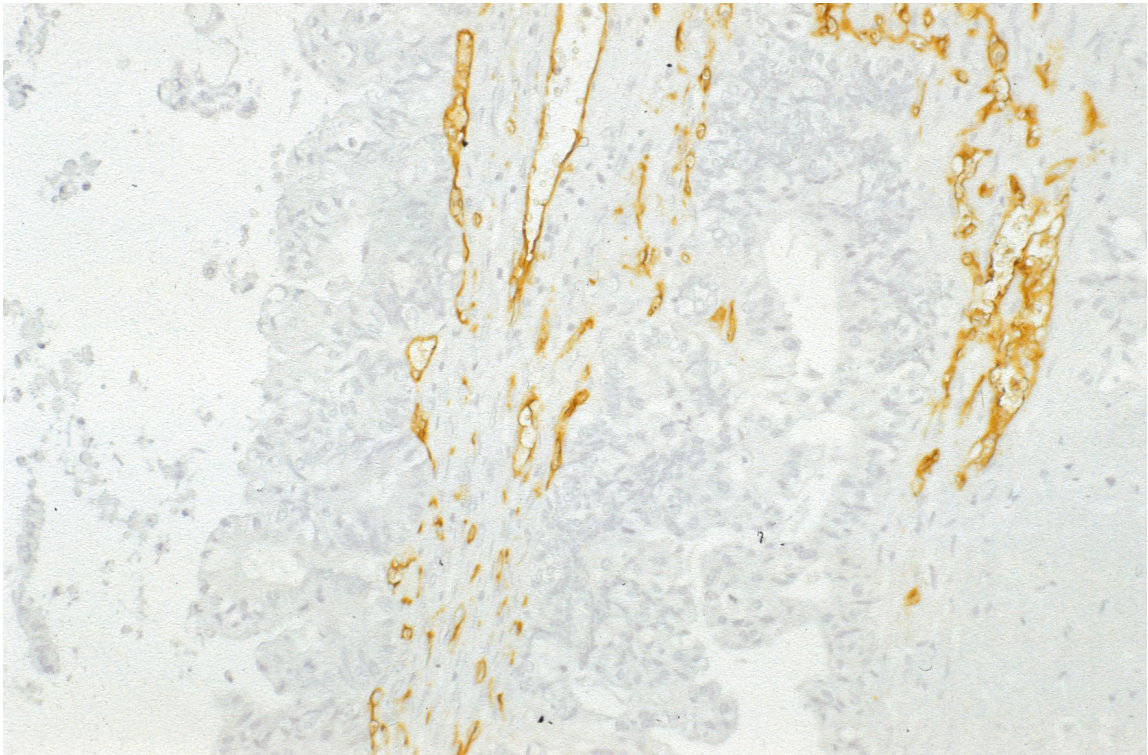
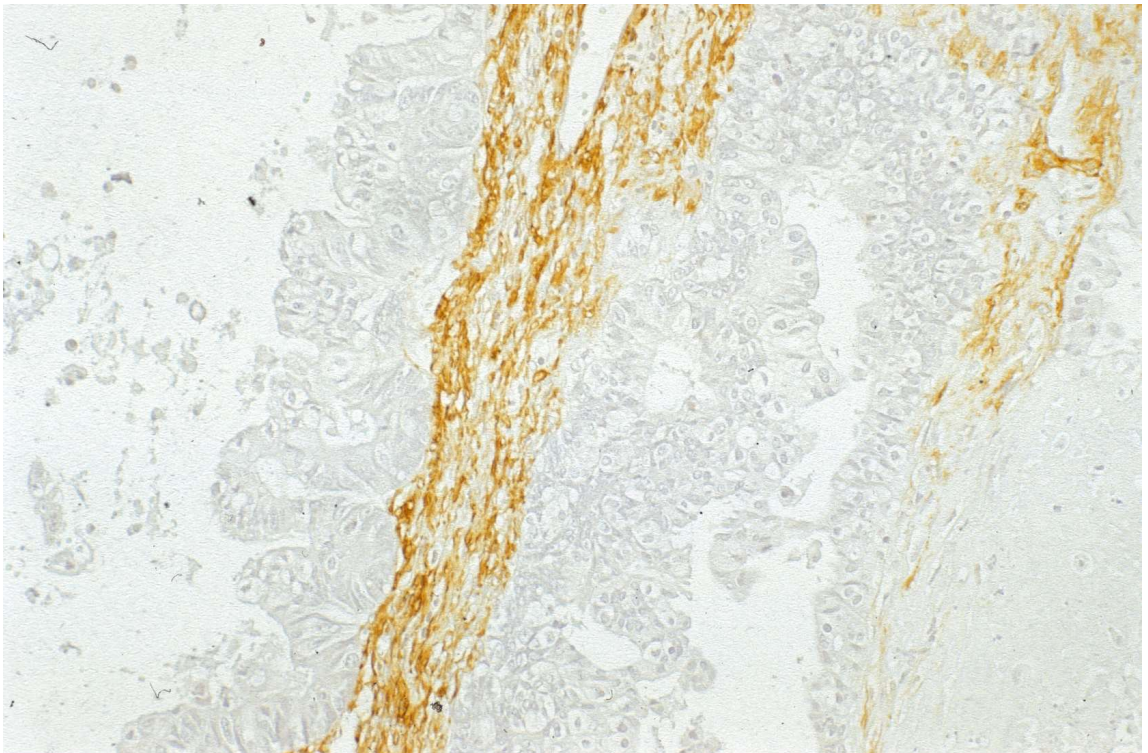


Abbildung 26

6-2.tif CD34, muzinöses Adenokarzinom, tumorassoziertes Stroma negativ



(6-1.tif) SMA, muzinöses Adenokarzinom, tumoröses Gewebe negativ, tumorassoziertes Gewebe positiv



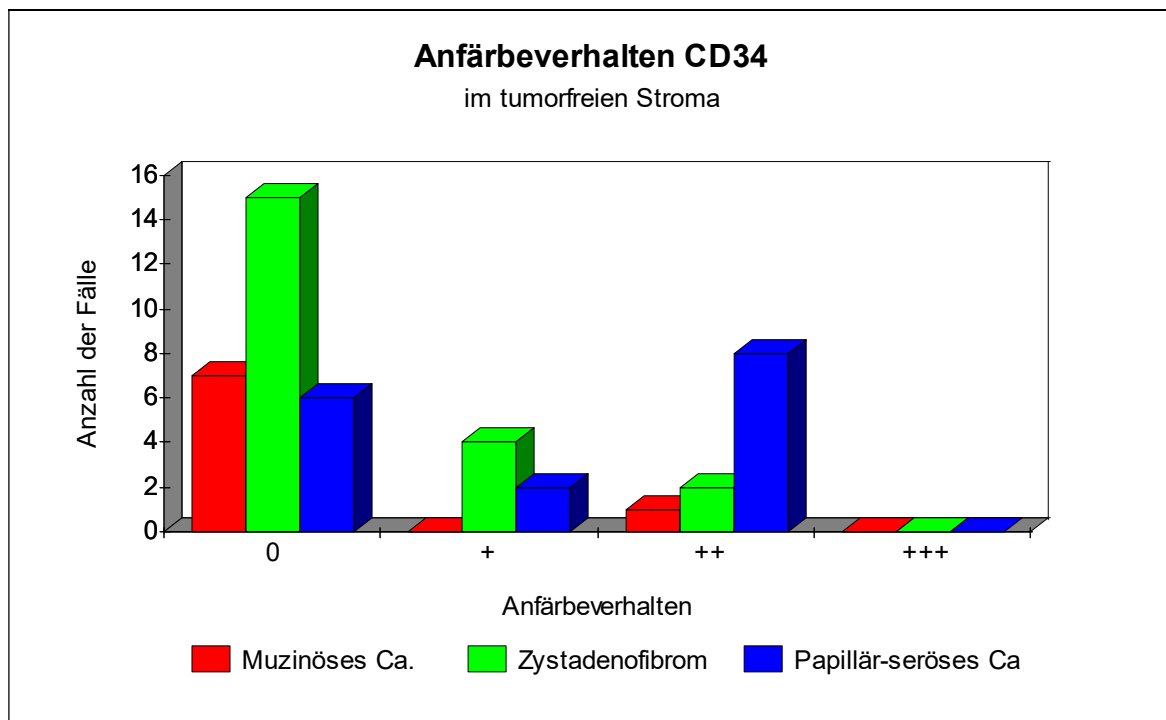
3.5 papillär-seröse Ovarialkarzinome

Papillär-seröse Ovarialkarzinome sind im Unterschied zu papillär-serösen Zystadenofibromen maligne Tumoren des Ovars. Die Zystenepithelien erfüllen also die Malignitätskriterien.

In der Betrachtung der Ergebnisse der Färbungen unter Berücksichtigung der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sind somit vor allem die Differenzen in den Färbungen noch als gesund zu bezeichnender Areale und solcher mit maligner Infiltration zu werten.

Während sich beim gesunden Ovar wie auch bei den papillär-serösen Zystadenofibromen das funktionelle ovarielle Stroma in der überwiegenden Zahl der Fälle nicht positiv auf CD34 reagierte, zeigte sich bei den vorliegenden papillär-serösen Ovarialkarzinomen eine deutlichere Färbereaktion des tumorfreien Stromas (Abbildung 27).

Abbildung 27



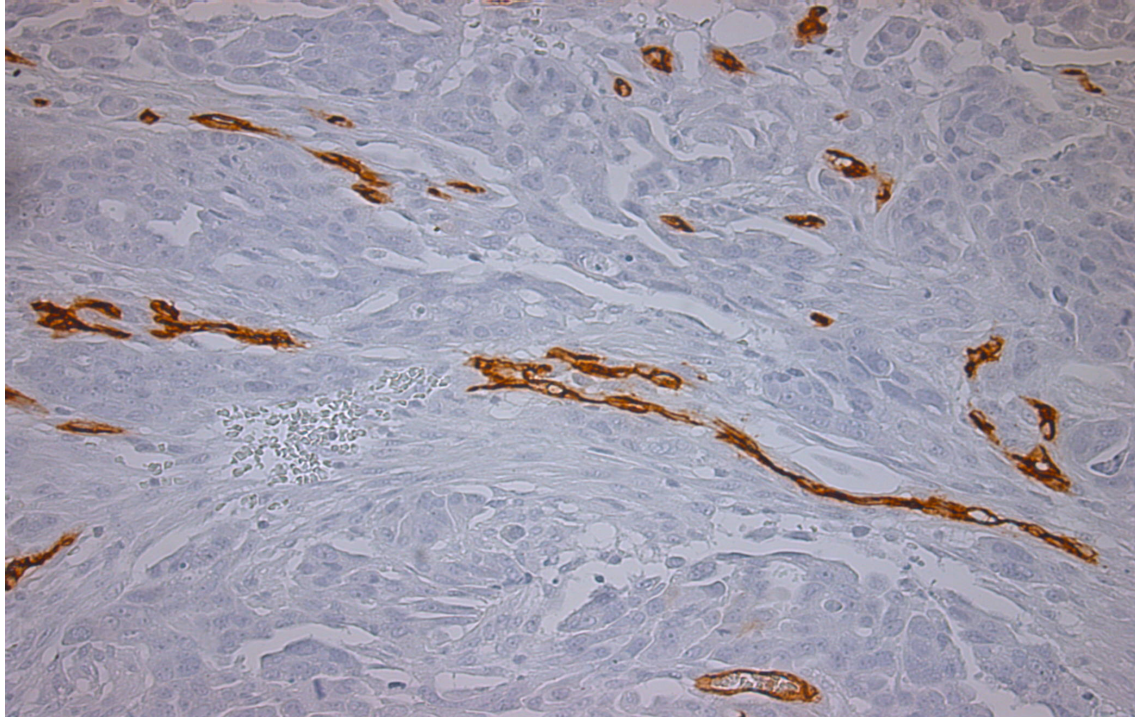
Einschränkend muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass es in den meisten Fällen schwierig ist, überhaupt tumorfreies Stroma eindeutig zu identifizieren. Die weitere Unterscheidung in funktionelles und bindegewebiges Stroma wäre theoretisch erforderlich, da sich bei der Untersuchung der gesunden Ovarien ja ein Farbeunterschied für CD34 zeigt, in der Praxis ist sie jedoch nicht umzusetzen. Die Areale tumorfreien Stromas sind in den vorhandenen Präparaten sehr klein. Es ist demnach wahrscheinlich, dass die erhöhte Anzahl Fälle CD34 positiven tumorfreien Stromas ein falsch positives Ergebnis ist, eine weitergehende Interpretation dieser Daten erscheint daher wissenschaftlich falsch, denn wenn nicht sicher CD34 positives tumorfreies funktionelles Stroma identifiziert werden kann, ist auch die Untersuchung auf einen CD34 Verlust in Gegenwart maligner Tumoren überflüssig. Festzuhalten ist jedoch die eindeutig negative Reaktion der tumorinfiltrierten Gebiete auf CD34 und α -SMA.

In Abbildung 28 wird diese Aussage bestätigt, zusätzlich erkennt man ein weiteres Phänomen, nämlich dass TGF β - und SPARC sich teilweise sehr deutlich anfärben. Abbildung 29 zeigt die Negativität der dysplastischen Epithelien für alle Marker außer TGF- β .

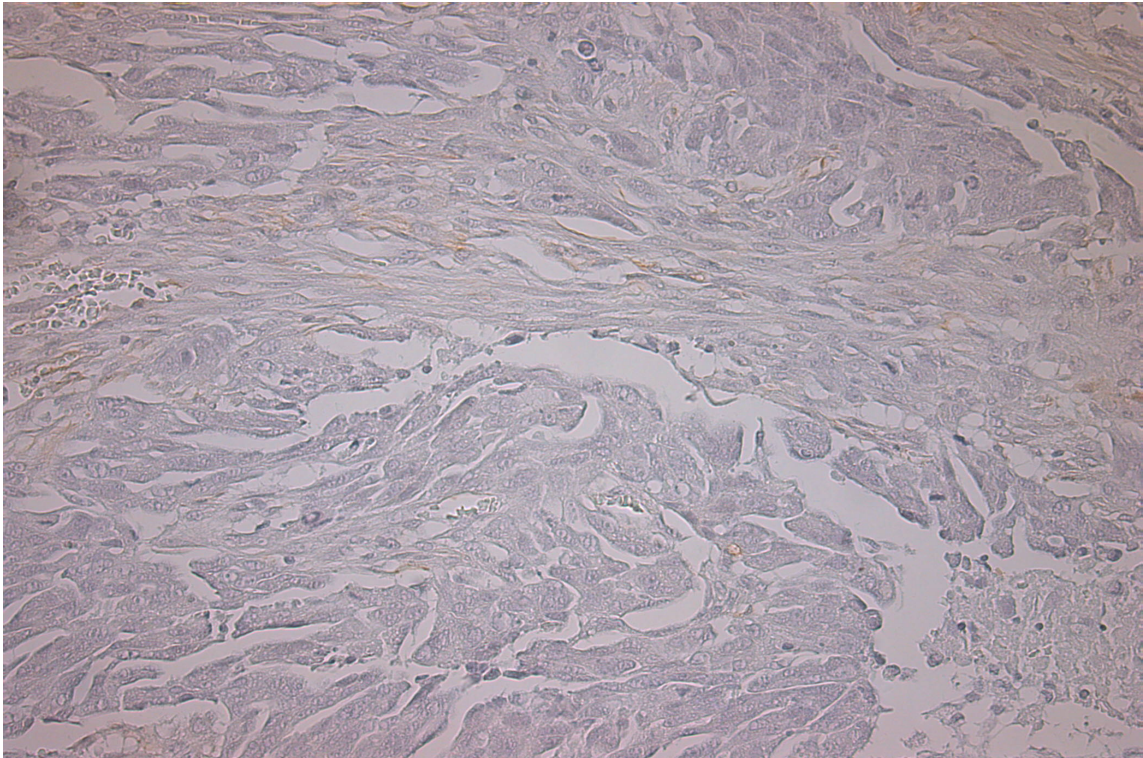
Ansonsten lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Färbungen erkennen.

Abbildung 28

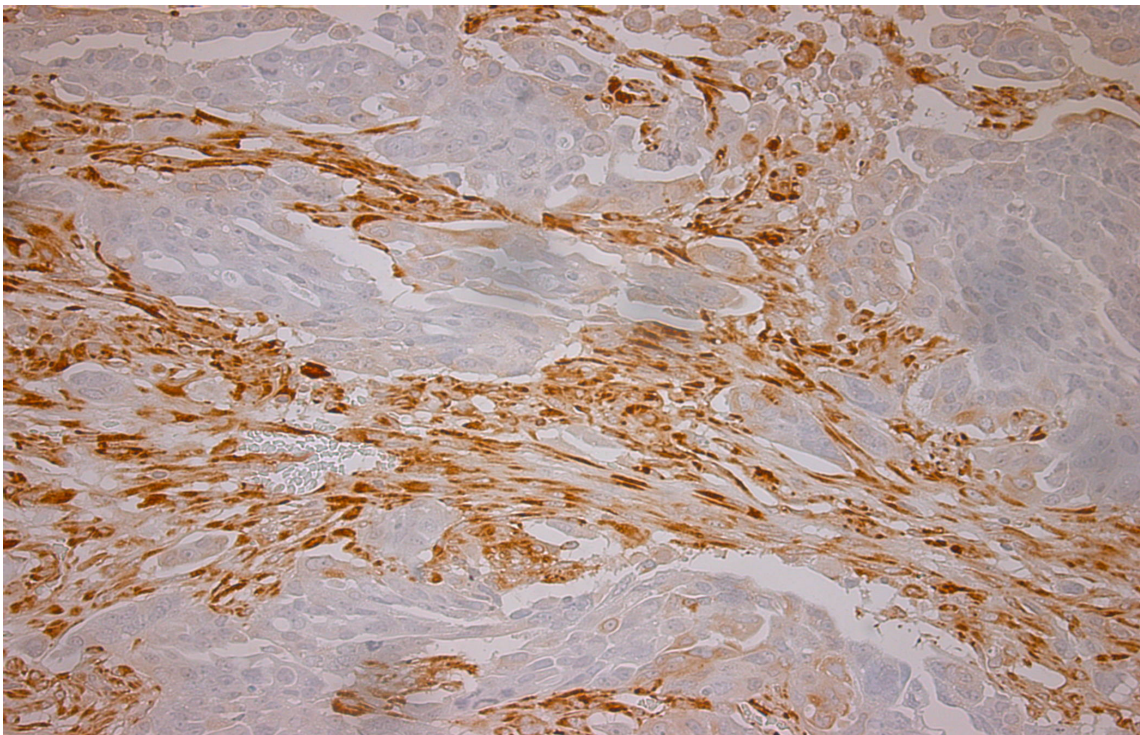
(7-8.tif) CD34 negatives Gewebe im papillär-serösen Ovarialkarzinom



(7-9.tif) α -SMA negatives Gewebe im papillär-serösen Ovarialkarzinom



(7-10.tif) SPARC im papillär-serösen Ovarialkarzinom



(7-11.tif) TGF- β im papillär-serösen Ovarialkarzinom

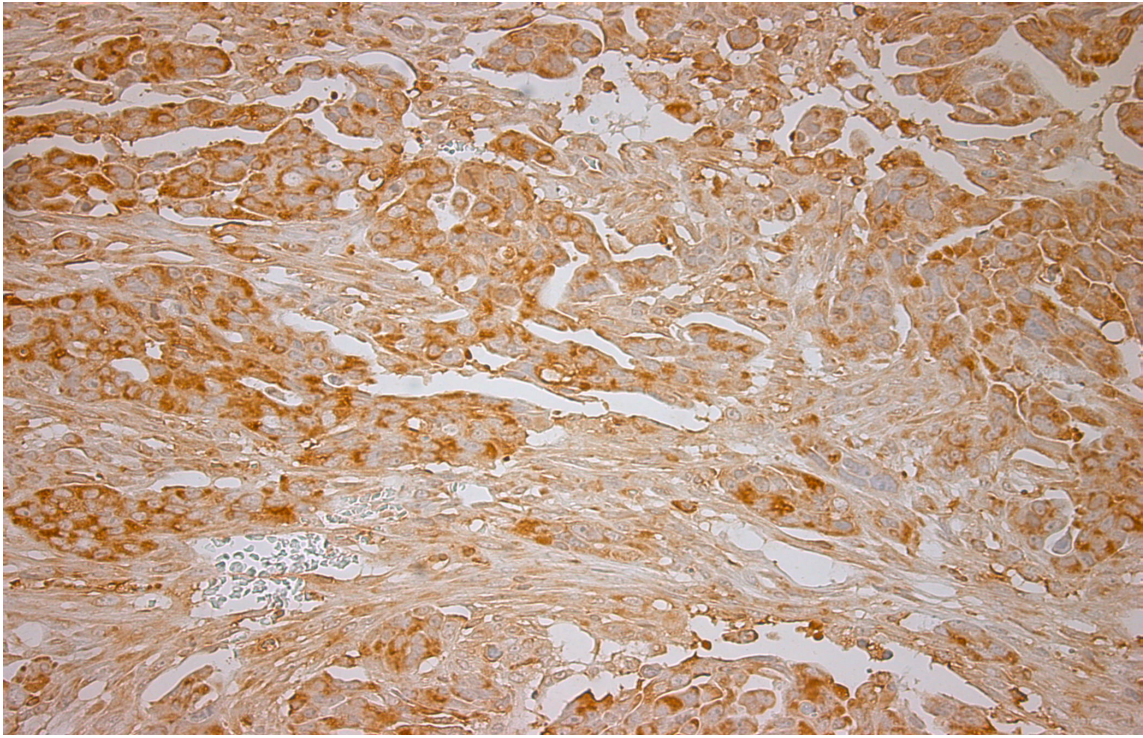
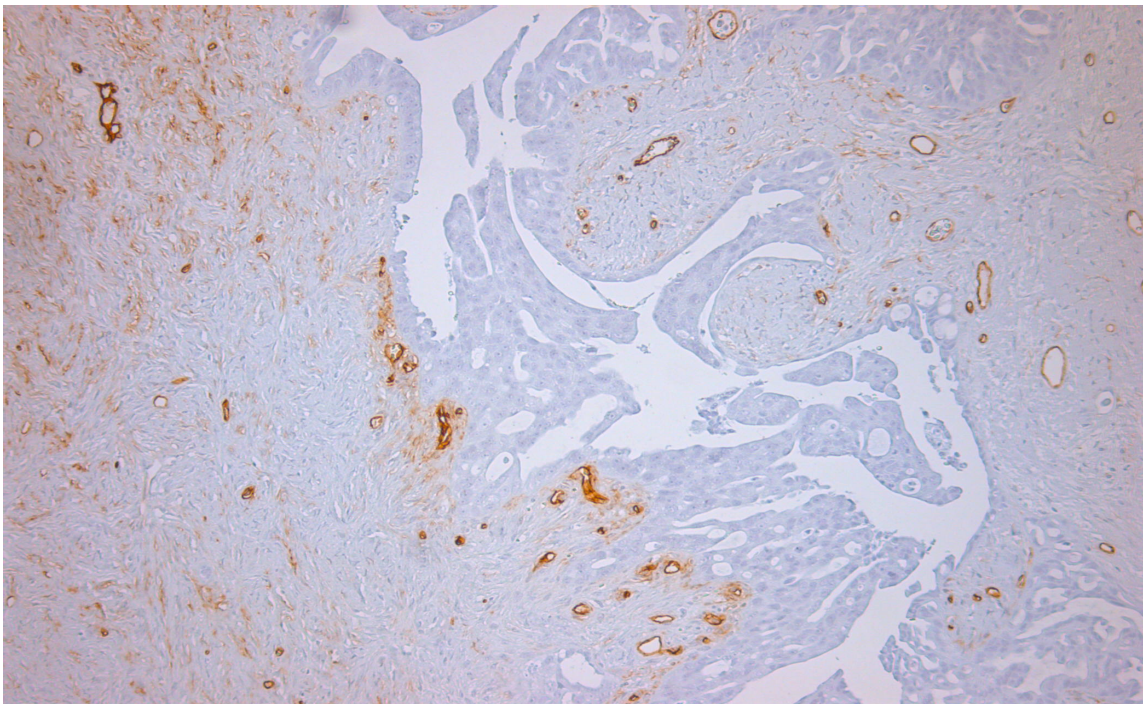
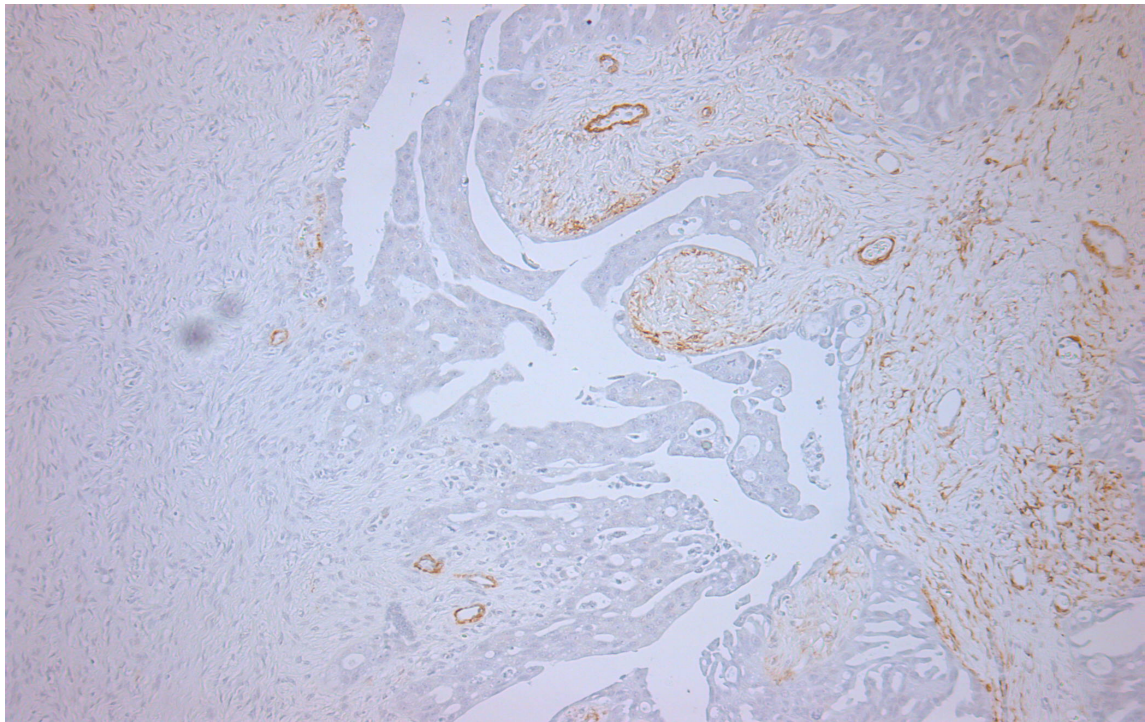


Abbildung 29

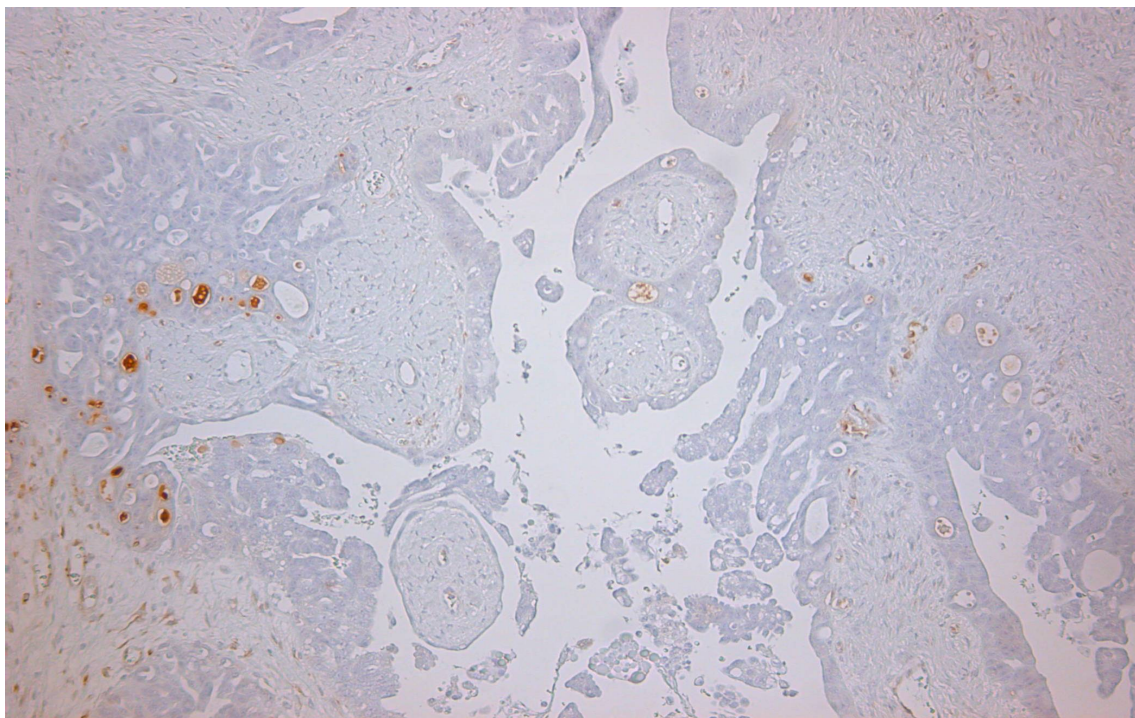
(7-16.tif) CD34 negatives dysplastisches Epithel im papillär-serösen Ovarialkarzinom



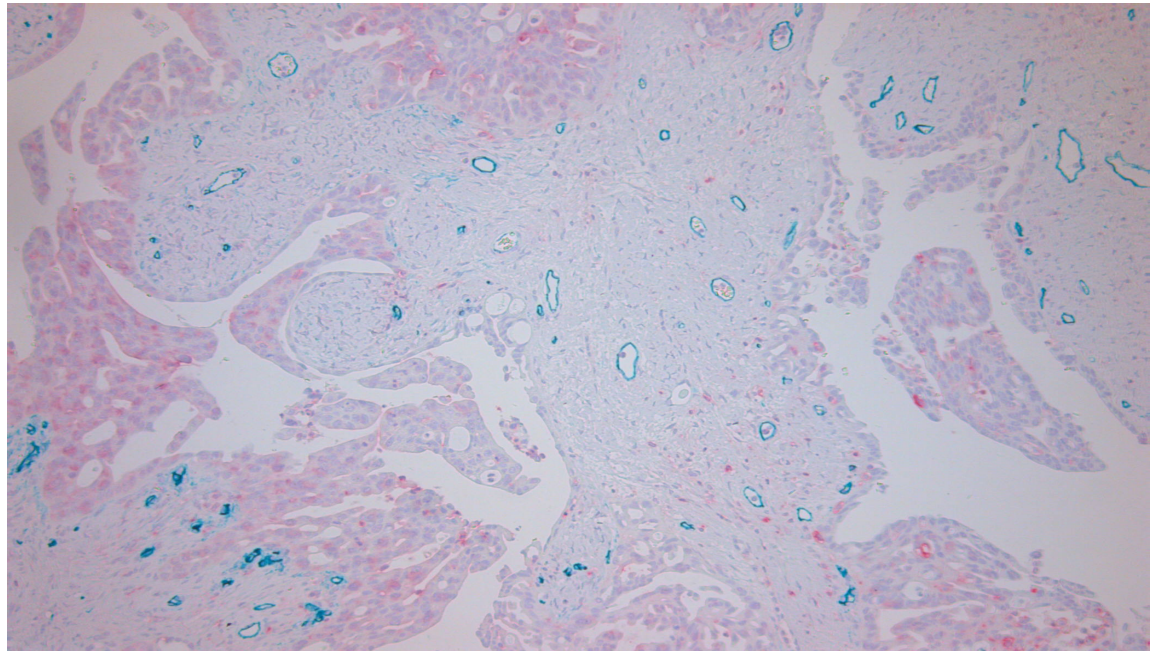
(7-17.tif) α -SMA negatives dysplastisches Epithel im papillär-serösen Ovarialkarzinom



(7-21.tif) SPARC negatives dysplastisches Epithel im papillär-serösen Ovarialkarzinom



(7-22.tif) Doppelfärbung CD34 (blau) und TGF- β (rosa) im papillär-serösen Ovarialkarzinom, dysplastisches Epithel ist TGF- β positiv



4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem immunhistochemischen Anfärbeverhalten von postmenopausalen Ovarien in Bezug auf die Zellpopulation der Fibrozyten. Es ist beabsichtigt, Unterschiede im Anfärbeverhalten ausgewählter Marker (CD 34, α -SMA, TGF- β Rezeptor, SPARC) in gut-, bösartigen und gesunden Gewebeabschnitten hervorzuheben. Dies zielt zum einen auf einen Erkenntnisgewinn/-überprüfung in Bezug auf lokalisationsbezogene (patho-) physiologischen Prozesse im Sinne der biochemischen Funktionalität der Marker als auch, sollten sich relevante Unterschiede zwischen gut- und bösartigen Läsionen nachweisen lassen, auf eine Anwendung im Rahmen von immunhistochemischen Färbetechniken zur Unterstützung der optischen Auswertung von Gewebeschnitten.

Die vorliegende Arbeit ergänzt ähnliche bereits publizierte wissenschaftliche Ansätze nun um die Darstellung am postmenopausalen Ovar.

Die Absicht der vorliegenden Arbeit, insbesondere das Anfärbeverhalten des Markers CD 34 an Ovarien in benignen und malignen Veränderungen zu beschreiben wurde erheblich durch das sehr schwache Ansprechen des medullären, also funktionellen ovariellen Stromas auf diesen Marker in allen untersuchten Diagnosen dominiert.

Die eingangs aufgestellte These, es komme in Anwesenheit von malignen Veränderungen zu einem Verlust von CD 34 positiven Fibrozyten kann daher nicht sicher bestätigt werden, aber das tumorassoziierte Stroma zeigte sich erwartungsgemäß CD34 negativ.

Weiterhin kann festgehalten werden, dass eine Abwesenheit von CD 34 positiven Zellen im Tumorgewebe muzinöser und papillär-seröser Ovarialkarzinome, aber auch in benignen Gewebsveränderungen wie dysplastischen Epithelien des papillär-serösen Zystadenofibroms besteht.

In Bezug auf die Anfärbbarkeit der postmenopausalen Ovarien mit α -SMA kann man die interessante Erkenntnis schlussfolgern, dass in ödematös aufgetriebenen Gewebsabschnitten, wie sie insbesondere bei muzinösen Ovarialtumoren vorkommen, die Deadhäsion der Zellen zu einer Induktion der Bildung von Glattmuskelaktin positiven Zellen führt, was sich, wenn auch nur in Einzelfällen, auch bei den benignen papillär-serösen Zystadenofibromen findet.

Die Frage, ob dies eine Autoregulation des Organismus darstellt um einer zellulären Deadhäsion als Grundvoraussetzung invasiven Wachstums vorzubeugen, ist erforschenswert.

Die Anfärbbarkeit der Ovarien für TGF- β und SPARC lässt aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse keinen weiteren Erkenntnisgewinn zu, als dass ovarielle Zellen in Anteilen diese Marker exprimieren.

Insgesamt sind die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit in ihren Aussagen mit denen gleicher Fragestellung an anderen Organen vergleichbar. Die Prägnanz des CD 34 Verlusts im tumorassoziierten Stroma ist allerdings geringer, was unter anderem der physiologischen Heterogenität des postmenopausalen Stromas geschuldet sein dürfte. Es bleibt auch zu prüfen, inwieweit der beschriebene CD 34 Verlust in allen Geweben vorkommt, oder es Unterschiede in der Ausprägung gibt.

Die für die Arbeit verwendete Methodik zur Gewinnung von Gewebeschnitten aus in Paraffin eingebetteten Resektionsgut sowie die immunhistochemische Färbemethode entspricht der standardmäßigen pathologischen Vorgehensweise und führt zu zuverlässigen Ergebnissen. Schwierigkeiten und mögliche Fehlerquellen ergeben sich eher aus der Bewertung der Gewebeschnitte, da im Unterschied zu numerisch messbaren Parametern sowohl die subjektive Erfahrung des Mikroskopeurs, die individuelle Struktur jedes einzelnen Präparats als auch die Differenzierung von gesunden und tumorös veränderten Gewebsabschnitten die Ergebnisse deutlich beeinflussen.

Diese Herausforderung wird sich durch die Verwendung der speziell für diese Arbeit entwickelten Bewertungsmaske genähert, ebenso erhöhen die beigefügten Abbildungen die Plausibilität der Ergebnisse. Zudem wurden die Diagnosen an einem pathologischen Zentrum erhoben und im Laufe der Auswertung erneut bestätigt.

Es werden nur postmenopausale Ovarien berücksichtigt, was allerdings, wegen des durchschnittlichen Erkrankungsalters der Patientinnen, zwingend erforderlich ist. Der Vergleich erfolgt zudem gesunden, ebenfalls postmenopausalen Ovarien.

Es erscheint in Anbetracht der vorliegenden Fallzahlen und der Heterogenität der Ergebnisse je nach Diagnose, An- oder Abwesenheit von Tumoren und Region des

Ovars nicht sinnvoll, eine ausführliche statistische Auswertung der Ergebnisse durchzuführen, dies würde die Validität der Ergebnisse überbeanspruchen. Zudem wurde bei vergleichbaren wissenschaftlichen Veröffentlichungen ebenfalls darauf verzichtet.

An faktischen Erkenntnissen liefert die vorliegende Arbeit die Beschreibung des komplexen immunhistochemischen Anfärbeverhaltens postmenopausaler Ovarien und einiger ortstypischer Pathologika, die in weiterführenden wissenschaftlichen Erforschungen näher und ggf. mit ergänzender Methodik beleuchtet werden müssen.

5. Zusammenfassung

Hintergrund:

Das Vorhandensein CD34 positiver Fibrozyten und der Verlust dieser Oberflächeneigenschaft im tumorassoziierten Stroma maligner Veränderungen wurde bereits für diverse Gewebeentitäten und deren möglichen malignen Prozesse dargestellt, zur Komplettierung geschieht dies hier am postmenopausalen Ovar.

Methode:

Anhand paraffinierter Gewebeproben erfolgte mit immunhistochemischen Standardfärbungen an Schnittpräparaten die lokalisierte Darstellung von Oberflächeneigenschaften wie CD 34, alpha-SMA; TGF-beta und SPARC und deren mikroskopische Auswertung.

Ergebnisse:

Das gesunde Stroma zeigt aber im Vergleich zu anderen Organen eine verminderte Deutlichkeit in Bezug auf die Verteilung CD 34 positiver Fibrozyten im gesunden Stroma, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einschränkt.

Frühere wissenschaftliche Erkenntnisse für andere Gewebe bestätigend findet sich auch im postmenopausalen Ovar ein Verlust der Anfärbbarkeit von Fibrocyten für CD 34 im tumorassoziierten Stroma maligner Veränderungen (mucinöses und papillär-seröse Ovarialkarzinome), korrelierend mit einem Anstieg der färberischen Nachweisbarkeit von alpha-SMA in diesem Bereich. Die für das invasive Tumorwachstum hypothetisch erforderliche Auflockerung der Zellverbände findet eine logische Entsprechung in alpha-SMA positiv gefärbten ödematös-papillären Gewebsabschnitten.

Abstract

Background:

The occurrence of CD34 positive fibrocytes and their loss in tumor-associated stroma of malignant tissue changes has been shown for many different organs. The present work completes this presentation for postmenopausal human ovaries.

Methods:

Paraffinated microtom slices of tissue samples were dyed with immunohistochemical standard method to show the local spreading of cell-associated antigens (CD 34, alpha-smooth muscle actin, TGF-beta receptor and SPARC). The results were evaluated by microscope.

Results:

The healthy ovarian stroma shows in comparison to tissue from other organs less presence of CD 34 positive fibrocytes, which restricts the following result. In comparison to former investigations there is also a loss of CD34 positive fibrocytes in the tumor-associated stroma of malignant ovarian tissue changes (squamous and papillary-serous ovarian cancer) combined with a rise of alpha-SMA. The cellular deadhaesion, which is hypothetically important for invasive process of malignant tissue changes, can be shown also by a rise of alpha-SMA on edematous papillary tissue regions.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Alle gezeigten Fotografien mikroskopischer Gewebsschnitte sowie Tabellen und schematische Zeichnungen wurden von der Verfasserin der vorliegenden Dissertation selbst angefertigt. Die Nennung von Quellen oder Urheberrechtsinhabern entfällt somit.

7. Chemikalienverzeichnis

(In alphabetischer Reihenfolge)

- **ABC Komplex**

Für Einfachfärbungen: Vectastain ABC Elite, Reagent A und B [Fa. Vector Laboratories]

Für Doppelfärbung: siehe „ für Einfachfärbung, ABC-AP Standard Vectastain ABC Kit [Fa. Vector Laboratories]

- **Alkohol:** Ethanol absolut [Fa. Riedel-deHaen]

- **Deckgläser** [Fa. Menzel]

- **Diaminobenzidinetetrahydrochloride: 3,3-**

Diaminobenzidinetetrahydrochloride app. 97% TLC [Fa. Sigma Aldrich]

- **Entellan** [Fa. Merck]

- **Mayers Hämalaunlösung** [Fa. Merck]

- **Methanol** pro analysi [Fa. Merck]

- **Mikrotom:** Schlittenmikrotom SM 2000 R [Fa. Leica]

- **Objektgläser:** „SuperFrost plus“ [Fa. Menzel]

- **PBS Puffer**

160g Natriumchlorid

4g Kaliumchlorid

23,3g Natriumdihydrogenphosphat mit 2 Mol Kristallwasser pro Kristall

4g Kaliumdihydrogenphosphat

} mit Aqua dest. auf 2l auffüllen, pH 7,4 einstellen und zum Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

- **Primärantikörper**

CD 34 [Fa. Dako, Bestellnr: M7165 1ml]

TGF- β -Rezeptor [Fa. Novocastra]

Osteonectin [Fa. Novocastra, Bestellnr: 600680]

SMA [Fa. Progen, Bestellnr: 61001]

CD 117 [Fa. Dako, C-Kit]

CD 83 [Fa. Novocastra, NCL-C083]

- **Sekundärantikörper**

Biotinylated Anti-Mouse IgM1 μ -chain specific (made in goat)

Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L)

Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L)

alle [Fa.Vector Laboratories]

- **Normalserum Horse** “normal horse serum” [Fa.Vector laboratories]
- **Substrat Kits** für die Doppelfärbung
AP-Substrate Kit Histo/Vector Red [Fa.Linaris]
Histogreen POD Substrat Kit [Fa.Linaris]
- **TBS Puffer**
53g Natriumchlorid
12g Tris
} auf 1000 ml mit Aqua dest auffüllen, pH 7,4 einstellen, zum Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
- **Tris-HCl Puffer**
60,57g Tris
500ml Aqua dest.
} mischen und mit 1N Salzsäure auf pH 7,4 einstellen, dann mit Aqua dest. auf einen Liter auffüllen, zum Gebrauch 1:10 verdünnen
- **Trypsinlösung**
300mg Trypsin
300mg Calciumchlorid
} in 300 ml Tris-HCl Puffer lösen und mit 1N Natronlauge auf pH 7,8 einstellen, zum Gebrauch 1:100 mit Tris-HCl Puffer verdünnen
- **Wasserstoffperoxid** 30% pro analysi [Fa.Merck]

8. Literaturverzeichnis

(Alphabetisch, Nummern aus Fließtext in eckigen Klammern)

Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN (2001) Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. J Immunol 166:7556-7562 [13] [16]

Barth PJ, Ebrahimsade S, Hellinger A, Moll R, Ramaswamy A (2002) CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. Virchows Arch 440:128-133 [31] [37]

Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R (2002) CD 34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. Virchows Arch 440:298-303 [20] [24] [38]

Barth PJ, Moll R, Ramaswamy A (2005) Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. Virchows Arch 446:532-536 [25] [39]

Barth PJ, Ramaswamy A, Moll R (2002) CD34+ fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. Virchows Arch 441:564-568 [32] [40]

Barth PJ, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R (2004) CD34+ fibrocytes, α -smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. Virchows Arch 444:231-234 [33] [41]

Barth PJ, Westhoff CC (2007) CD 34 + fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2(3):221-7 [5]

Bradshaw AD, Sage EH (2001) SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107:1049-1054 [51]

Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A (1994) Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81 [4]

Cancer fact sheet, www.who.int 2015 [1]

Catteau X, Simon P, Noel JC (2014) Myofibroblastic reaction is a common event in metastatic disease of breast carcinoma: a descriptive study. *Diagn Pathol.* 9:196 [43]

Catteau X, Simon P, Noel JC (2014) Myofibroblastic stromal reaction and lymph node stauts in invasive breast carcinoma: possible role of the TGF-beta1/TGF-betaR1 pathway. *BMC Cancer* 14:499 [12]

Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL (2003) The is more then one kind of fibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ and invasive breast lesions. *J Clin Pathol* 56:271-276 [21] [26] [42]

Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R (1997) The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capabel of priming naive T-cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6307-6312 [6] (10)

Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R (1998) Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 160:419-425 [9]

Dvorak HF. (1986) Tumor: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med 315:1650-1659 [3]

Ebrahimsade S, Westhoff CC, Barth PJ (2007) CD34+ fibrocytes are preserved in most invasive lobular carcinomas of the breast Pathol Res Pract 203(9):695-8 [28]

Framson PE; Sage EH (2004) SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? J Cell Biochem 92:679-690 [2] [53]

Hagedorn H, Elbertzhagen A, Ruoss I, Sauer U, Nerlich AG (2001)
Immunohistochemical analysis of major TGF-beta isoforms and their receptors in laryngeal carcinomas. Virchows Arch 439:531-539 [19] [47] [49]

Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN (2001)
Fibrocytes induce an angionetic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. FASEB J 15:2215-2224 [11]

Kacar A, Arikok AT, Kokenek Unal TD, Onder E, Humcumenoglu S, Alper M (2012)
Stromal expression of CD 34+, alpha smooth muscle actin and CD 26/DPPIV in squamous cell carcinomas of the skin: a comparative immunohistochemical study. Pathol Oncol Res 18 (1): 25-31 [44]

Kuroda N., Nakayama H., Miyazaki E., Toi ., Hiroi M., Enzan H. (2005) The distribution of CD 34 positive stromal cells and myofibroblasts in colorectal carcinoid tumors. Histol Histopathol 20:27-33 [30]

Metz C.N. (2003) Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. Cell.mol.life.Sci. 60(2003):1324-1350 [15]

Moore T, Lee AH (2001) Expression of CD34 and bcl-2 in phyllodes tumours, fibroadenomas and spindle cell lesions of the breast. *Histopathology* 38:62-67 [14] [22] [23]

Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M (2000) Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol* 53:626-629 [29]

Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Kiyoku H, Toi M, Hiroi M (2001) CD34 positive stroma cells in gastric adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 54:846-848 [35]

Nakayama H.m, Enzan H., Miyazaki E., Kuroda N., Toi M. (2002) Lack of CD 34 positive stromal cells within angiomyomas (vascular leiomyomas) *J Clin Pathol* 55:395-396 [34]

Natsugoe S, Xiangming C, Matsumoto M, Okumura H, Nakashima S, Sakita H, Ichigami S, Baba M, Takao S, Aikou T (2002) Smad4 and transforming growth factor beta 1 expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 8:1838-1842 [48]

Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk DE, Gown AM (1995) Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 43:791-800 [50]

Ramaswamy A, Moll R, Barth PJ (2003) CD34 fibrocytes in tubular carcinomas and radial scars of the breast. *Virchows Arch* 443:536-540 [27] [45]

Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH (1994) TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. J Cell Physiol 158:169-179 [17] [18]

Schiemann BJ, Neil JR, Schiemann WP (2003) SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor- β -signaling system. Mol Biol Cell 14:3977-3988 [52]

Soma L, LiVolsi VA, Baloch ZW (2001) Dendritic interstitial and myofibroblastic cells at the border of salivary gland tumors. Arch Pathol Lab Med 125: 232-236 [36]

Suster S, Fisher C (1997) Immunoreactivity for the human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in lipomatous tumors. Am J Surg Pathol 21: 195-200 [8]

The impact of cancer (2005) WHO global InfoBase online; www.who.int [54]

Van der Rijn M, Rousse RV (1994) CD 34. A review. Appl. Immunohistochem. 2:71-80 [7]

Wessel C, Westhoff CC, Nowak k, Moll I, Barth PJ (2008) CD 34(+) fibrocytes in melanocytic nevi and malignant melanomas of the skin. Virchows Arch 453(5):485-9 [46]

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Folgende Damen und Herren waren während des Studiums der Humanmedizin an der
Philipps Universität meine akademischen Lehrer:

in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth , Basler, Baum, Eilers, Feuser, Gotzen, Griss, Grundmann,
Grzeschik, Gudermann, Herrmann-Lingen, Hertel, Hofmann, Jungclas, Kretschmer,
Krieg, Klose, Lang, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters,
Neubauer, Oertel, Radsack, Remschidt, Renz, Richter, Röper, Rothmund, Schäfer,
Schmidt, Schneider, Schrader, Vogelmeier, Weiler, Werner, Wulf

in Fulda

Bonzel , Czernik, Hellinger, Jaspersen, Wörsdörfer

10. Danksagung

Für die Möglichkeit der Promotion, die Überlassung des Themas sowie die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanke ich mich ausdrücklich bei Herrn Prof. Dr. Barth, damals leitender Oberarzt des Instituts für Pathologie der Philipps Universität Marburg und heute Oberarzt des Instituts für Pathologie der Universität Münster. Auch möchte ich mich bei Fr. Morowkina für die Einarbeitung in Immunhistochemische Färbemethoden bedanken.

Meinem Mann, Lars Heinrich gilt mein Dank für die fürsorgliche Begleitung auf dem Weg zur vorliegenden Arbeit und die Unterstützung bei der Bereitstellung der dazu notwendigen Zeit im fordernden Familien- und Arbeitsalltag.